

Salicylate가 담배 미분화세포 isoperoxidase A₃의 활성화에 미치는 영향

이 미 영

순천향대학교 생명과학부

Effects of Salicylate on the Activity of Isoperoxidase A₃ from Tobacco Callus

Mi-Young Lee

Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, Choongnam 336-745, Korea

Abstract - Salicylate is involved in the induction of pathogen-related proteins and plant defense response. The effects of salicylate on the activity isoperoxidase A₃ from tobacco callus (*Nicotiana tabacum* L.) and the protection against the enzyme inactivation by salicylate in the presence of Fe²⁺ were examined. About 20% and 85% activity losses of peroxidase occurred at 0.48 mM and 0.6 mM salicylate, respectively, showing that isoperoxidase A₃ was inactivated by salicylate. The inactivation occurred depending on pH and showed noncompetitive inhibition mode. Moreover, inactivation of the enzyme by salicylate was completely protected in the presence of Fe²⁺. Apoperoxidase without heme moiety was constructed and the effects of various metal ions on the recovery of enzyme activities were investigated. More than 80% of the activity was reconstituted by the addition of Fe²⁺ or hemin. However, the enzyme activity was not recovered by Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ or Mn²⁺.

Key words : Salicylate, tobacco callus, isoperoxidase A₃

서 론

Peroxidase[E.C.1.11.1.7]는 생물계 전체에 널리 존재하는 효소로서 고등 식물과 동물, 그리고 미생물에서도 그 존재가 확인되고 있다. 고등식물에 존재하는 peroxidase는 여러 가지 동위효소 형태로 존재하는데 horseradish의 경우 최고 20여개의 동위효소가 존재한다. 이 효소는 세포의 분화와 성장을 조절하는 기능을 가지고 있으며 indole-3-acetic acid의 산화, 환원형 pyrimidine

nucleotide의 산화, pyridoxal과 관련된 화합물의 산화, methional의 ethylene으로의 전환, phenolic compound의 산화, lignification과 세포벽의 합성, 병원체에 대한 방어 등 여러 가지 다양한 촉매 반응을 나타낸다(van Huystee and Cairns 1982; Padu *et al.* 1993; Sanchez *et al.* 1993). 뿐만 아니라 peroxidase는 넓은 기질특이성을 가지고 있어서 guaiacol, *o*-dianisidine, phenylenediamine, ferulic acid, caffeic acid, esculetin, scopoletin, H₂O₂ 등의 다양한 기질에 대하여 동위효소별로 특이적인 산화반응을 나타낸다. Horseradish (Welinder 1991), Korean radish (Lee and Kim 1994; Lee *et al.* 1994; Park and Kim 1996; Lee and Kim 1998a, b, c), 담배 (Kim *et*

* Corresponding author: Mi-Young Lee, Tel. 041-530-1355, Fax. 041-530-1355, E-mail. miyoung@sch.ac.kr

al. 1980) 등 다양한 식물에서 peroxidase가 정제되어 개별 동위효소 별로 효소학적 특성이 규명되어 왔고, 유전자구조와 기능이 밝혀지고 있다. 그 결과 peroxidase 동위효소들이 전기이동도, 일차구조, 면역학적 특성 및 기질 특이성에 있어서 몇 군으로 나누어질 수 있었으며 세포내에서의 생리학적 기능도 서로 다를 것으로 추측하고 있다. Peroxidase의 활성에 영향을 주는 요소로는 병원균에 대한 감염, 식물의 유전자형, 빛, 손상 등의 주위환경과 온도, 염분, 중금속 등의 각종 스트레스와 auxin, cytokinin, gibberellin, ethylene 같은 호르몬 등을 들 수 있다(Bayçu *et al.* 1999). 또한 peroxidase 동위효소의 발현 패턴이 세포의 성장과 노화, 환경조건 등에 따라서 변화하기 때문에 어느 특수조건에서의 peroxidase 동위효소의 패턴변화를 생리생화학적인 기능과 연결시키고자 하는 노력이 많이 시도되었다(Castillo 1992; Lee *et al.* 2000)

식물은 각종 병원균의 침입을 받았을 때 이들 병원균의 성장을 저해하는 phytoalexin을 합성하여 체내에 축적하며, 식물의 세포벽 또는 병원균의 세포벽에서 분해된 올리고당과 glucoside 등의 여러 가지 물질들이 식물의 방어기작을 유도하는 elicitor로 작용한다. 어떤 내병성 식물들은 병원균이 침입했을 때 그 부위만을 선택적으로 피사시켜서 병원균의 확산을 방지하는 과민반응을 나타내어서 차후의 병원균의 침입을 억제하는 acquired resistance를 유도하는 경우가 있다. 이때 그 병원균이 침입했던 자리가 아닌 곳에서도 저항성이 나타나는 경우가 있으며 흔히 pathogen-related protein (PR protein)의 합성이 수반된다. Salicylate는 병원균이 침입하거나 혹은 병원균이 없을 때도 몇가지 PR protein의 합성과 저항성을 유도하는 신호전달물질로서 최근 여러 학자들의 관심의 대상이 되고 있다. 담배세포의 경우 salicylate에 의해 유도되는 15개 유전자를 cycloheximide에 대한 반응성을 기준으로 class I, II, III, IV로 나누었는데, 그 중 class I 유전자인 C18-1이 ethylene response element binding protein 1 (ERE BP1)으로 밝혀졌다. 이에 비해 class III 유전자인 G8-1은 salicylate에 의해서만 유도되는 유전자로 확인되었다(Horvath *et al.* 1998). 뿐만 아니라 salicylate에 의해 유도되는 유전자가 WRKY DNA-binding protein을 코딩한다고 보고되기도 했다(Chen and Chen 2000). 세포내 salicylate의 수용체는 catalase와 ascorbate peroxidase 등의 heme-protein으로 밝혀져 있다(Sanchez-Casas and Klessig 1994; Durner and Klessig 1995; Rüffer *et al.* 1995). Salicylate는 세포내의 catalase나 ascorbate peroxidase와 결합하여 효소활성을 억제하게 되고 이로 인하여 세

포내 H₂O₂의 농도증가와 함께 PR 유전자의 발현 및 병원균에 대한 저항성이 증가한다고 알려져 있으나 아직 세포내에서의 신호전달체계와 작용기작이 확실히 밝혀져 있지 않은 상태이다.

본 연구에서는 담배세포에 존재하는 7개의 동위효소(A₁, A₂, A₃, A₄, C₁, C₂, C₃) 중 분자량 등의 물리화학적 특성과 기질특이성(Lee and Kim 1994)이 특이적인 isoperoxidase A₃를 순수정제한 후 salicylate에 의한 활성변화를 분석함으로써 salicylate에 의한 guaiacol peroxidase의 활성억제 양상을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 담배 미분화세포의 배양

담배 (*Nicotiana tabacum* L., var Virginia 115)의 미분화세포배양을 위하여 Murashige와 Skoog (MS) 배지를 기본 배지로 사용하였으며, 0.8% agar를 첨가한 MS 배지 30 ml에 2~3주 자란 미분화세포를 1~1.5 g씩 떼어 접종하여 미분화세포를 배양하였다.

2. 효소원의 분리

Isoperoxidase A₃의 분리는 이전의 보고내용(Lee *et al.* 1988)에 따라서 수행하였다. 배양한 담배 미분화세포를 90% 황산암모늄 침전법으로 분획화시킨 후 20 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 6.0)으로 DEAE-Sephacel ion exchange chromatography를 수행하여 효소용액을 용출시켰다. Peroxidase 활성이 있는 용출액을 모아 Sephacryl S-100 gel filtration을 수행하여 단일 효소단백질로 분리할 수 있었다.

3. Peroxidase의 활성측정 및 단백질 정량

Peroxidase의 활성은 guaiacol과 H₂O₂를 기질로 하여 470 nm에서 흡광도의 증가를 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 측정하였다(Kim *et al.* 1980). 효소반응액은 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 6.0), 15 mM guaiacol, 5 mM H₂O₂와 효소 용액을 포함하여 최종 부피가 1 ml가 되도록 하였다. 효소반응은 H₂O₂를 마지막으로 가한 후 측정하였다. 효소 활성도 1 unit은 470 nm에서 1분간 흡광도 1이 증가하는 효소의 양으로 정하였으며, 비활성도는 단백질양에 대한 효소 활성(unit)으로 결정하였다.

효소액의 단백질은 Lowry 방법을 사용하여 측정하였다(Lowry *et al.* 1951).

4. Salicylate가 peroxidase의 활성화에 미치는 영향

Salicylate가 담배의 guaiacol peroxidase의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 salicylate의 농도를 0, 0.24, 0.48 mM로 변화시켜가면서 합성기질인 guaiacol의 산화정도를 비교하였다. pH 변화에 따른 salicylate의 효과를 측정하기 위하여 salicylate를 각각 0, 0.12, 0.24, 0.36, 0.48, 0.6, 0.72, 0.84, 0.96 mM씩 가하여 다양한 반응 pH에 따라 효소활성도의 변화를 측정하였다.

5. Salicylate에 의한 peroxidase활성억제 유형조사

활성억제제인 salicylate 0, 0.24, 0.48 mM에 대하여 기질인 guaiacol의 농도를 다양하게 변화시킨후 Lineweaver-Burk reciprocal plot을 작성하였다. 각 plot의 기울기를 측정하여 salicylate에 의한 peroxidase활성억제 유형을 알아보았다.

6. Fe²⁺ 첨가가 salicylate에 의한 peroxidase활성 억제에 미치는 효과

Salicylate에 의한 peroxidase의 활성억제 반응조건에서 각각 2 μM, 6 μM, 8 μM FeSO₄를 반응시킨 후 guaiacol의 산화정도를 측정하여 Fe²⁺ 첨가가 salicylate에 의해 억제된 peroxidase의 활성회복에 미치는 효과를 측정하였다.

7. 여러 가지 중금속이 apoperoxidase의 활성 재구성에 미치는 효과

Apoperoxidase는 acid-acetone 방법에 따라 제조하였다(Joo and Kim 1991). Isoperoxidase A₃ 용액에 acid-acetone을 처리하여 heme을 포함한 상등액 분획을 제거하고 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 6.0)에 대하여 투석하여 apoperoxidase를 제조하였다. 제조된 apoperoxidase에 hemin 용액 혹은 Fe²⁺을 반응시켜 peroxidase를 재구성시킨 후 guaiacol에 대한 산화활성을 측정하였다. 뿐만 아니라 Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ 첨가에 의한 apoperoxidase의 활성회복 정도를 서로 비교하였다.

결과 및 고찰

담배 미분화세포 (*Nicotiana tabacum* L., var Virginia 115)에는 pH 7.0에서 starch gel electrophoresis를 수행했을 때 4개의 anodic isoperoxidase (A₁, A₂, A₃, A₄)와 3

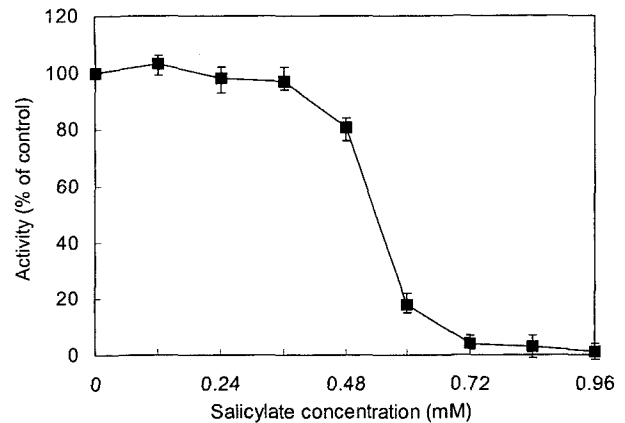


Fig. 1. Effects of various concentrations of salicylate on the activity of isoperoxidase A₃ from tobacco callus. Guaiacol oxidizing ability of the enzyme was determined in the presence of salicylate at pH 6.

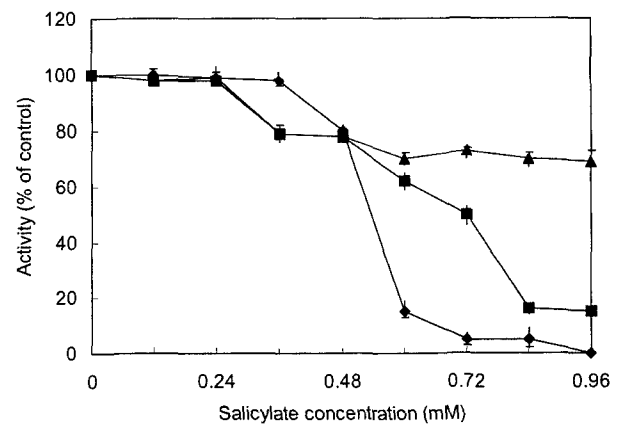


Fig. 2. Inhibition of isoperoxidase A₃ activity by salicylate at various pH values. Guaiacol oxidizing ability of the enzyme was determined in the presence of various concentrations of salicylate at pH 6, 7 or 8. ◆—◆ pH 6; ■—■ pH 7; ▲—▲ pH 8.

개의 cathodic isoperoxidase (C₁, C₂, C₃)가 존재하였다(결과 미제시). DEAE-Sephacel ion exchange chromatography와 Sephacryl S-100 gel filtration으로 분리한 isoperoxidase A₃는 분자량이 38 KDa인 monomeric protein으로서 기질인 guaiacol에 대한 최적 pH는 6.0, Km값은 5 mM로 밝혀졌다(Lee et al. 1988). 본 연구에서는 담배세포의 guaiacol peroxidase인 isoperoxidase A₃의 활성화에 salicylate가 미치는 영향을 알아보기 위하여 salicylate의 농도를 0에서 0.96 mM로 변화시켜가면서 기질인 guaiacol의 산화정도를 비교하였다(Fig. 1). Salicylate의 농도를 0에서 0.48 mM까지 변화시켰을 때

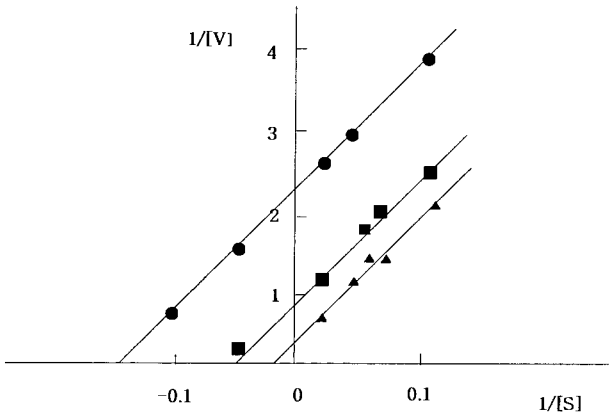


Fig. 3. Lineweaver-Burk reciprocal plot of isoperoxidase A₃ inhibition by salicylate. Guaiacol oxidizing ability of the enzyme was determined in the presence of 0, 0.24 or 0.48 mM salicylate, and the slope of the double reciprocal plot of activity vs guaiacol concentrations for the enzyme was measured. ▲—▲ control; ■—■ 0.24 mM salicylate; ●—● 0.48 mM salicylate.

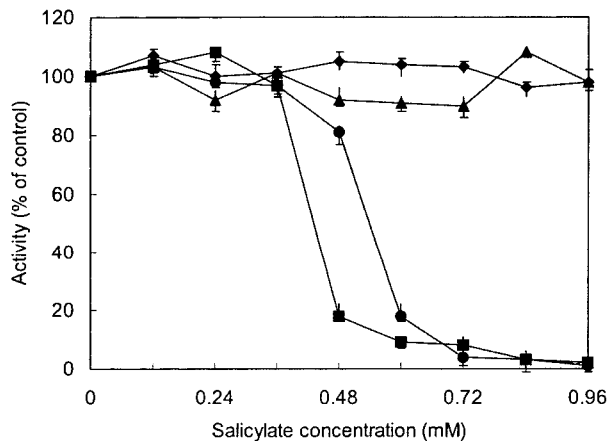


Fig. 4. Effects of Fe²⁺ on the inhibition of isoperoxidase A₃ by salicylate. The recovery of the enzyme activity by the addition of 0, 2, 6 or 8 μM Fe²⁺ was determined in the presence of various concentrations of salicylate. ■—■ salicylate alone ●—● salicylate+2 μM Fe²⁺ ▲—▲ salicylate+6 μM Fe²⁺ ◆—◆ salicylate+8 μM Fe²⁺.

salicylate에 의하여 peroxidase의 활성이 약 20% 억제되었다. 그러나 salicylate의 농도를 0.6 mM 이상으로 증가시켰을 때 peroxidase의 활성이 급격하게 감소되기 시작하여 효소활성이 80% 이상 감소되었다. 이러한 결과는 salicylate에 의하여 isoperoxidase A₃의 활성이 억제됨을 보여준다. 담배잎의 ascorbate peroxidase의 경우 0.1

Table 1. Effects of various metal ions on the recovery of the activity of apoperoxidase A₃ from tobacco callus

Addition	Relative activity (%)
Apoperoxidase alone	30±2.5
Apoperoxidase+hemin	82±3.1
Apoperoxidase+Fe ²⁺	85±2.1
Apoperoxidase+Cu ²⁺	29±1.9
Apoperoxidase+Zn ²⁺	20±2.2
Apoperoxidase+Co ²⁺	28±2.4
Apoperoxidase+Mn ²⁺	25±1.9

The activity of intact isoperoxidase A₃ was determined to be 100%.

The final concentrations of hemin and various metal ions were 10 μM.

All determinations were made in triplicate and the results were expressed as mean±S.E.

mM salicylate에 의하여 59%의 활성이 감소되었고 1 mM의 salicylate에 의하여 95%의 활성이 감소되었다고 보고되었다 (Durner and Klessig 1995). 그러나 horseradish peroxidase의 경우 guaiacol에 대한 산화활성은 salicylate에 의하여 전혀 영향을 받지 않았으므로 (Durner and Klessig 1995), guaiacol peroxidase와 ascorbate peroxidase에 대한 salicylate의 효과가 서로 다를 것으로 추측되고 있다. 담배잎에 salicylate를 처리하면 catalase와 ascorbate peroxidase의 활성이 감소되고 이로 인해서 내재성 H₂O₂의 함량이 50~60% 증가할 뿐만 아니라 PR 관련유전자들이 활성화된다고 보고되었다. 그러나 이때 외부에서 첨가한 H₂O₂는 내재성 H₂O₂보다 PR관련유전자의 발현을 효과적으로 유도하지 못하였다 (Chen *et al.* 1993).

Fig. 2에서는 다양한 pH 조건에서 salicylate에 의한 guaiacol isoperoxidase A₃의 활성억제반응을 살펴보았다. pH 6에서는 0.6 mM salicylate에 의하여 peroxidase 활성이 약 85% 감소되었고 pH 7에서는 약 40%의 활성 감소를 보였다. Salicylate의 농도를 0.72 mM 이상으로 증가시켰을 때 pH 6에서는 효소활성이 거의 남아있지 않았으나, pH 7에서는 약 50%의 활성감소만을 나타내었다. 그러나 반응 pH를 8.0으로 증가시킨 경우 전 salicylate 농도구간에서 80% 이상의 효소활성이 유지되었다. 이러한 결과는 salicylate에 의한 peroxidase활성 억제현상이 pH 의존적 반응임을 뜻한다. 뿐만 아니라 salicylate의 치환기의 형태와 종류에 따라서 효소활성 억제력에 차이가 있을 가능성을 내포한다. 실제로 salicylate의 각종 유도체를 사용하여 담배잎의 ascorbate peroxidase활성을 pH 7.0에서 측정된 결과 salicylate (2-hydroxybenzoic acid)에 의하여 ascorbate peroxidase활성은

약 83% 억제되었으나 3-hydroxybenzoic acid와 4-hydroxybenzoic acid는 ascorbate peroxidase활성에 거의 영향을 미치지 못하였다(Durner and Klessig 1995). Catalase와 aconitase의 경우에도 benzoic acid에 붙은 치환기의 형태와 종류에 따라 catalase 억제양상에 현저한 차이를 보였고, Fe과 salicylate사이의 결합력을 나타내는 apparent K_d가 Scatchard 분석법에 의해 약 13.5~30 μM로 결정된 바 있다(Sanchez-Casas and Klessig 1994).

Fig. 3에서는 다양한 농도의 salicylate에 의해서 guaiacol의 산화가 억제되는 정도를 Lineweaver-Burk reciprocal plot을 통하여 비교하였다. Salicylate에 의한 담배 isoperoxidase A₃의 활성억제반응 양상을 알아보기 위하여 활성억제제로 작용한 salicylate의 농도에 따라 결정된 각 plot의 기울기를 측정하였다. 그 결과 salicylate 농도에 따른 각 plot의 기울기가 서로 동일하여 평행선을 이루었다. 따라서 salicylate에 의한 guaiacol isoperoxidase A₃의 활성억제양상이 noncompetitive inhibition임을 알 수 있다.

Fig. 4는 salicylate에 의한 isoperoxidase A₃의 활성억제가 여러 가지 농도의 Fe²⁺ 첨가에 의하여 회복됨을 보여준다. 2 μM Fe²⁺는 다양한 농도의 salicylate에 의한 효소활성억제를 회복시키지 못하였으나, 6 μM Fe²⁺와 8 μM Fe²⁺는 salicylate에 의한 효소활성을 거의 완벽하게 회복시킴을 알 수 있다. 이러한 결과들은 salicylate가 직접적으로 Fe²⁺를 chelating하여 isoperoxidase A₃의 효소활성을 억제할 가능성을 보여준다. 그러나 salicylate에 의한 효소활성억제 양상은 noncompetitive inhibition으로서(Fig. 3), noncompetitive inhibition에서는 억제제와 효소가 단독으로는 결합하지 못하고 효소와 기질의 복합체 형태에서만 결합할 수 있다는 사실을 고려한다면, salicylate가 단독으로 효소내 Fe²⁺와 직접적으로 결합할 가능성은 희박하다고 할 수 있다.

Peroxidase로부터 heme잔기를 제거하여 apoperoxidase를 제조한 후 여러가지 금속이온이 apoperoxidase A₃의 활성회복에 미치는 효과를 조사하였다(Table 1). Welinder의 분류법에 의하면 식물 peroxidase는 class III superfamily로서 효소의 활성자리나 그 부근에 Fe²⁺를 포함하는 heme잔기가 존재할 뿐만 아니라 Fe²⁺의 결합에 필요한 His의 imidazole이 잘 보존되어 있었다(Dunford 1999). Table 1에서 알 수 있듯이 isoperoxidase A₃에 acid-acetone을 처리하여 heme잔기를 제거했을 때 효소활성이 약 70% 감소되었다. 그러나 apoperoxidase A₃에 hemin과 Fe²⁺를 처리하게 되면 효소활성이 80% 이상 회복되었다. 이러한 결과는 isoperoxidase

A₃의 효소활성에 Fe²⁺가 반드시 필요하다는 사실을 보여준다. 그러나 Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ 등은 apoperoxidase를 재구성시켜서 효소활성을 회복시키지 못했을 뿐만 아니라 오히려 효소활성을 감소시켰다.

본 연구의 결과를 종합하여 볼 때 salicylate에 의한 담배 isoperoxidase A₃의 활성억제반응의 기작으로는 salicylate가 isoperoxidase A₃ 구조내의 Fe²⁺에 직접 결합할 가능성 보다는 기질산화력에 영향을 미칠 수 있는 효소내 자리에 결합하여 활성억제를 간접적으로 일으킨 것으로 추측된다. [¹⁴-C]salicylate를 사용한 결합실험을 살펴보면(Rüffer 1995), salicylate는 식물에서 유래된 catalase와 결합하여 효소활성을 억제시킬 수 있었으나 동물에서 유래된 bovine catalase와는 반응하지 않았다. 이러한 결과는 식물 catalase 구조내에 salicylate와 반응할 수 있는 특이성과 반응조절능이 있다는 것을 뜻한다. 뿐만 아니라 salicylate는 catalase 이외에도 aconitase와 lipoxygenase와 결합하여 효소활성을 억제시킬 수 있었음에도 불구하고 아직 효소구조내의 결합위치와 작용기작이 확실히 밝혀져 있지 않은 상태이다. Salicylate는 세포내 catalase나 ascorbate peroxidase 등의 hemeprotein의 특정부위에 특이적으로 결합하여 기질산화력을 감소시키고 궁극적으로는 세포내 저항성 유도 단백질과 방어관련 단백질의 신호전달체계에서 2차 전달자로 작용한다고 알려져 있다(Metraux *et al.* 1990). 따라서 salicylate에 의하여 guaiacol peroxidase인 isoperoxidase A₃의 활성이 억제되는 기작을 밝힐 수 있다면, 식물세포의 salicylate에 의한 신호전달체계를 이해하는데 큰 도움이 될 것이다. 이를 위하여 동위원소를 이용한 결합력 측정과 함께 담배세포 isoperoxidase A₃의 아미노산 서열 및 3차구조 결정 등이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

식물의 저항성과 방어관련물질 유도에 관련된 salicylate가 담배 미분화세포로부터 분리된 isoperoxidase A₃의 활성에 미치는 영향을 살펴보고, Fe²⁺의 첨가에 의하여 salicylate에 의한 효소활성 억제가 보호되는 양상을 조사하였다. 다양한 농도의 salicylate가 isoperoxidase A₃의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 0.48 mM salicylate에 의하여 isoperoxidase A₃의 활성이 약 20% 감소되었고, 0.6 mM salicylate에 의하여 효소활성이 85% 이상 감소되었다. 이러한 결과는 salicylate에 의하여 isoperoxidase A₃가 억제됨을 보여준다. Salicylate에 의한 isoperoxidase A₃의 억제반응은 pH 의존적으로 일

어났을 뿐만 아니라, noncompetitive inhibition 양상을 나타냈다. 뿐만 아니라 salicylate에 의한 isoperoxidase A₃의 활성억제는 Fe²⁺ 첨가에 의하여 거의 완벽하게 보호되었다. Isoeroxidase A₃로부터 heme부분을 제거하여 apoperoxidase를 제조한 후 여러가지 금속이온이 apoperoxidase의 활성회복에 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과 hemin과 Fe²⁺ 첨가에 의하여 apoperoxidase의 활성이 80% 이상 회복되었으나 Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ 등은 apoperoxidase의 활성을 재구성시키지 못하였다.

사 사

본 연구는 순천향대학교 자체 학술연구비(1999)로 수행되었습니다.

인 용 문 헌

- Bayçu G, E Eruz, H Caner and B Gönençgil. 1999. Heavy metal stress and peroxidases: I. peroxidase activity and chlorophyll content in response to cadmium and lead in *Pinus Pinea*. *Plant Peroxidase Newsletter* 12:13-21.
- Castillo FJ. 1992. Peroxidase and stress. In: C Penel, Th Gaspar, H Greppin, eds, *Plant peroxidases, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects*, Univ of Geneva, pp. 187-203.
- Chen C and Z Chen. 2000. Isolation and characterization of pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.* 42(2):378-396.
- Chen Z, H Silver and DF Klessig. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262:1883-1885.
- Dunford HB. 1999. Heme peroxidase nomenclature. In *Plant peroxidase newsletter* 13:65-71.
- Durner J and DF Klessig. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11312-11316.
- Horvath DM, DJ Huang and NH Chua. 1998. Four classes of salicylate-induced tobacco genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11(9):895-905.
- Joo HS and SS Kim. 1991. Inactivation of the peroxidase activity of rabbit hemoglobin by diethylpyrocarbonate. *Korean Biochem. J. (presently J. Biochem. Mol. Biol.)* 24:585-593.
- Kim, SS, SH Wender and EC Smith. 1980. Isolation and characterization of two isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* 19:165-168.
- Lee JA, HW Shin and MY Lee. 2000. Effects of various environmental stresses on the peroxidase activities from rice seedlings. *Korean J. Environ. Biol.* 18:331-336.
- Lee MY, JA Kim and SS Kim. 1988. Characteristics of two anodic isoperoxidases from tobacco callus. *Korean Biochem. J. (presently J. Biochem. Mol. Biol.)* 21:161-168.
- Lee MY and SS Kim. 1994. Characteristics of six isoperoxidases from Korean radish root. *Phytochemistry* 35:276-290.
- Lee MY, Y Choi and SS Kim. 1994. Purification and immunological relationships of six radish isoperoxidases. *Plant Physiol. Biochem.* 32:259-265.
- Lee MY and SS Kim. 1998a. Characteristics of a low molecular weight minor anionic isoperoxidase A_{3n} from radish. *J. Biochem. Mol. Biol.* 31:548-553.
- Lee MY and SS Kim. 1998b. Inactivation and cleavage of radish peroxidase by various reducing agents. *Phytochemistry* 49:23-27.
- Lee DJ and SS Kim. 1998c. The regulation of 5' upstream region of a Korean radish cationic peroxidase gene by gibberellic acid and abscisic acid. *Plant Science* 139:105-115.
- Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr and RJ Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 93:265-275.
- Metraux JP, H Signer, J Ryals, E Ward, M Wyss-Benz, J Gaudin, K Raschdorf, E Schmid, W Blum and B Inverardi. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250:1004-1006.
- Padu E, E Hansen and A Tanav. 1993. Changes in soluble and cell wall associated peroxidase during the lignification of wheat xylem cells. *Plant peroxidase: Biochemistry and Physiology III International Symposium*. pp. 287-290.
- Park JH and SS Kim. 1996. Isolation, restriction mapping, and promoter sequence analysis of an isoperoxidase gene from Korean radish, *Raphanus sativus* L. *J. Biochem. Mol. Biol.* 29(1):52-57.
- Rüffer M, B Steipe and MH Zenk. 1995. Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Letters* 377:175-180.
- Sanchez-casas P and DF Klessig. 1994. A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol.* 106:1675-1679.
- Sanchez M, G Revilla and I Zarra. 1993. Role of cell wall

- peroxidases in the cessation of growth in pine hypocotyls. *Plant peroxidase: Biochemistry and Physiology III International Symposium*. pp. 283–286.
- van Huystee RB and WL Cairns. 1982. Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Phytochemistry* 21:1843–1847.
- Welinder KG. 1991. The plant peroxidase superfamily. In: J Lobarzewski, H Greppin, C Penel, Th Gaspar, eds, *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, University M. Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and University of Geneva, Switzerland, pp. 3–13.

(Received 22 July 2001, accepted 5 September 2001)