

토마토 유묘에 있어서 저온과 수분 스트레스에 대한 항산화효소의 활성 차이

강남준 · 조명환 · 이한철 · 최영하 · 엄영철
원예연구소 시설원예시험장

Differential Responses of Antioxidant Enzymes on Chilling and Drought Stress in Tomato Seedlings (*Lycopersicon esculentum* L.)

Nam Jun Kang*, Myeong Whan Cho, Han Chul Rhee, Young Hah Choi, and Yeong Cheol Um
Protected Horticulture Experiment Station, NHRI, RDA, 20 Gangdong Gangseu-gu Busan 618-800, Korea

Abstract. Responses of antioxidant enzymes on chilling and drought stress in tomato seedlings were investigated. Growing patterns of tomato based on fresh weight of tomato seedlings were severely affected by chilling and drought stress. Fresh weight of tomato seedlings were reduced by 69.5% in chilling stress and 50.6% in drought stress compared to those in the unstressed control seedlings after 12 days of stress. The specific and gel activity of SOD and POD in the leaves, shoots, and roots of tomato seedlings were significantly increased by chilling and drought stress. Activation of SOD and POD activity by chilling stress were higher in the roots than those of drought stress. However, activation of SOD and POD activity by drought stress were higher in the leaves and shoots than those of chilling stress. The specific and gel activity of GR in the leaves, shoots, and roots of tomato seedlings were also significantly increased by chilling and drought stress. When the seedlings were treated with chilling or drought stress, one GR isozyme band (GR-3) was newly expressed in the leaves of tomato seedlings. The specific and gel activity of PPO was significantly increased in the roots and shoots of tomato seedlings by chilling and drought stress, respectively. However, the specific and gel activity of PPO in the leaves is no difference between stressed and controlled tomato seedlings.

Key words : chilling, drought, GR, POD, PPO, SOD, tomato

*Corresponding author

서 언

작물은 온도나 수분을 포함한 여러 가지 환경 스트레스를 받게 되면 체내에 삼투조절물질의 축적, 세포막의 변성 및 활성산소종의 생성과 같은 생리적 또는 생화학적으로 불리한 변화가 일어나 장해를 받게 된다. 특히 과다하게 생성된 활성산소종은 산화적 스트레스를 유기시키는 요인으로 작용하여 작물의 생육과정에 피해를 입히는 것으로 알려져 있다(Asada, 1999; Bowler 등, 1992; Heath, 1987). 과산화수소나 환원 산소종(O_2^-) 등과 같은 활성산소종은 정상적인 작물의 생육과정에서도 생성되어 여러 가지 스트레스 반응에 대한 내성을 증진시키는 매개체 역할을 하기도 하지만, 과다

하게 생성될 때 생리적으로 중요한 세포막, 지질, 단백질 및 핵산과 같은 세포질 구성 요소에 유해한 수산화기나 유도체를 생성시키는 유독성 물질로서 대사작용을 방해하여 장해를 일으킨다(Elstner, 1987; Foyer, 1993; Heath, 1987; Lee와 Lee, 2000; Kendall과 McKersie, 1989; Salin, 1991).

그러나 대부분의 작물은 활성산소종에 대한 방어 기작으로 토코페롤이나 카로틴 등과 같은 항산화 물질, 글루타티온이나 아스코르브산과 같은 수용성 환원제 및 SOD나 POD 등과 같은 항산화 효소 등을 포함하는 복합 항산화 시스템을 가지고 있다(Davies, 1995). 특히 항산화 효소가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 작물에는 superoxide dismutase(SOD), per-

oxidase(POD), catalase(CAT), ascorbic peroxidase(APX), glutathione reductase(GR) 등의 여러 가지 항산화효소가 존재하는 것으로 밝혀져 있다(Foyer, 1993; Monk 등, 1989). 항산화 효소 중에서 SOD는 환원 산소종(O_2^-)을 과산화수소와 산소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소로서 효소 분자에 들어있는 금속 조효소의 종류에 따라 Cu/Zn-SOD, Mn-SOD 및 Fe-SOD로 구분된다(Bannister 등, 1987; Bowler 등, 1992). SOD에 의해서 유기된 과산화수소는 POD나 CAT에 의해서 물분자와 산소 분자로 분해됨으로써 과도한 활성 산소종에 의한 피해를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Anderson 등, 1995; Salin, 1991). 또한 GR은 아스코르브산의 생성을 촉진하는 효소로서 글루타티온과 아스코르브산 대사작용에 중요한 역할을 하는 APX의 활성을 촉진시키는데 중요한 역할을 한다. 또한 각종 스트레스에 대한 방어기작 중의 하나가 polyphenol oxidase(PPO)의 활성화에 의한 세포벽의 리그닌화인데, PPO는 리그닌화에 관여하여 구조적으로 세포벽을 단단하게 하여 스트레스에 대한 내성을 증진시키기도 하며, 페놀화합물을 산화시켜 항균물질인 quinone을 생성하는 데도 관여하는 것으로 알려져 있다(Sommer 등, 1994).

본 연구는 토마토 유묘에 있어서 저온과 건조 스트레스에 의해 유기되는 항산화 효소의 활성 변화를 구명하여 시설원에 재배지에서 빈번하게 발생하는 스트레스 피해를 줄일 수 있는 기초 자료를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시험재료와 스트레스 처리

시험재료는 토마토(*Lycopersicon esculentum* L.) 서건(사까다 종묘) 품종을 버미클라이트에서 발아 시킨 후 본 엽이 1매 전개 시 저온 처리와 건조 처리를 위하여 플라스틱 포트의 크기를 달리하여 정식하였다. 저온 처리를 위한 토마토 유묘는 직경이 15 cm인 플라스틱 포트에 정식하였고, 건조 처리를 위해서는 직경이 30 cm인 플라스틱 포트에 정식하여 낮과 밤의 온도가 각각 25°C와 18°C로 조절된 유리온실에서 10일 동안 관리하였다. 정식 후 본 엽이 4매 전개된 10일째부터 저온 처리와 건조 처리를 하였다. 저온 처리는 광도가 $200 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 유지되는 식물 성장상을 이용

하였는데, 일장은 낮과 밤을 각각 12시간으로 조절하여 온도는 5°C로 처리하였다. 건조 처리는 낮과 밤의 온도가 25°C와 18°C로 조절된 유리온실에서 수행하였는데, 토양수분 함량은 토양수분 장력에 기초하여 -50 kPa로 조절하였다. 토양수분 공급은 관수자동제어기인 Rich-5330(Agronet, Korea)을 이용하였고 토양수분 장력 측정은 전자식 토양수분 장력센서(SKM850C2, SDEC)을 이용하였다. 대조구는 기온이 18/25°C(밤/낮)로 조절된 유리온실에서 토양수분을 -20 kPa로 조절하여 관리하였다.

2. 단백질 추출

효소의 활성을 측정하기 위한 수용성 단백질은 pH가 8.0으로 조정된 100 mM Tris-HCl 완충용액으로 잎, 줄기 및 뿌리로 구분하여 추출하였다. Polytron(PT-3100, Kinematica)을 이용하여 시료 5 g당 10 mL의 완충 용액으로 마쇄한 후 15,000×g로 4°C에서 10분간 원심분리(Allegra 64R, Beckman)하였다. 원심분리 후 추출액에 존재하는 소분자 화합물을 제거하고자, PD-10 column(Pharmacia-LKB)을 통과시켜 얻은 단백질 분획을 효소의 활성 측정 및 동위효소 분석 시료로 사용하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 Bradford 방법(Bradford, 1976)으로 측정하였다.

3. 효소의 활성 측정

SOD의 활성은 NBT 환원법을 사용하여 측정하였다(Beyer와 Fridovich, 1987). 활성 측정을 위한 반응물은 50 mM Na-carbonate(pH 10.2), 1.3 μM riboflavin, 13 mM methionine, 65 μM NBT 및 단백질 추출액으로 구성하였다. 반응물이 들어 있는 시험관을 25°C의 광 상태에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계(DU 650, Beckman)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였는데, 대조구는 광을 조사하지 않은 반응물을 사용하였다. SOD 활성은 Asada 등(1974)의 식을 이용하여 NBT 환원 저해율로 계산하였다.

POD의 활성은 반응물에 과산화수소를 첨가하여 guaiacol이 tetraguaiacol로 형성되는 양을 측정하였다(Putter, 1974). 반응물은 10 mM potassium phosphate(pH 7.0) 용액에 0.3 mM guaiacol, 0.1 mM H_2O_2 및 단백질 추출액을 혼합하여 25°C에서 1분간 반응시

킨 후 분광광도계(DU 650, Beckman)를 이용하여 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성은 mg 단백질당 분당 μmol 의 guaiacol이 산화되는 것으로 하였으며 extinction coefficient는 290 nm에서 $6.439 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하였다.

GR의 활성은 Rao 등(1996)의 방법에 준하여 pH가 7.8로 조절된 100 mM potassium phosphate 용액으로 측정하였다. 반응화합물은 1.0 mM EDTA, 0.1 mM NADPH, 0.5 mM GSSG, 100 mM potassium phosphate(pH 7.8) 및 효소 추출액으로 구성되었는데, 25 °C에서 NADPH를 첨가함으로써 반응을 시작하였다. 효소의 활성은 NADPH의 산화에 의해서 감소되는 흡광도를 분광광도계(DU-650, Beckman)을 이용하여 340 nm에서 측정하였다. 효소 활성은 mg 단백질당 분당 μmol 의 NADPH가 산화되는 것으로 하였으며 extinction coefficient는 340 nm에서 $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하였다.

PPO의 활성은 Mohammadi와 Kazemi(2002)의 방법에 준하여 pH가 6.4로 조절된 25 mM citrate phosphate를 사용하여 측정하였다. 반응화합물은 5 mM L-proline, 20 mM pyrocatechol, 25 mM citrate phosphate 및 효소 추출액으로 구성하였다. 활성은 pyrocatechol을 첨가한 후 25°C에서 1분간 반응 후 515 nm에서 증가하는 흡광도를 분광광도계(DU-650, Beckman)를 사용하여 측정하였다. 효소의 활성은 mg 단백질당 분당 측정되는 흡광도를 표시하였다.

4. 동위효소 분석

동위효소는 sodium dodecyl sulfate(SDS)가 포함되지 않은 10% polyacrylamide 겔에서 시료 당 20 μg 의 단백질로 조정하여 전기영동하였다. 전극 완충 용액은 pH가 8.8로 조절된 Tris-glycine이었으며 겔 당 30 mA로 조정하여 4°C에서 5시간 전개시켰다. 전기영동 후 기질이 함유된 용액에 겔을 넣어 30°C 압 상태에서 반응을 유도한 후 밴드 양상을 조사하였는데, 동위 효소에 따른 겔 염색 용액의 조성 조건은 다음과 같다.

Superoxide dismutase(SOD, EC.1.15.1.1)는 2.5 mM nitroblue tetrazolium(NBT)이 함유된 50 mM potassium phosphate(pH 7.8) 용액에 겔을 넣어 30°C 압 상태에서 25분간 전처리하여 동위효소를 활성화시켰다.

전처리한 겔은 다시 2.5 mM NBT와 30 mM riboflavin이 함유된 50 mM potassium phosphate(pH 7.8)에 넣어 암 상태에서 30분간 처리한 후 실온에서 광을 비추어 반응시켰다(Rao 등, 1996).

Peroxidase(POD, EC.1.11.1.7)는 4.0 mM의 H_2O_2 와 9.0 mM의 ρ -phenylenediamine이 함유된 0.1 M Na-citrate(pH 5.0) 용액에 겔을 넣어 30°C 암 상태에서 15분간 염색하였다(Olson과 Varner, 1993).

Glutathione reductase(GR, EC.1.6.4.2)는 3.5 mM L-glutathione oxidized(GSSG), 0.25 mM methylthiazoletetrazolium(MTT), 0.34 mM 2,6-dichlorophenolindophenol(DPIP), 및 0.5 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced(NADPH)가 함유된 200 mM Tris-HCl(pH 7.5)용액에 겔을 넣어 30°C 암 상태에서 1시간 동안 반응시켰다(Rao 등, 1996).

Polyphenol oxidase(PPO, EC.1.14.18.1)는 100 mM Na-phosphate(pH 7.0) 용액에 겔을 넣어 실온에서 5분 동안 전 처리한 후 10 mM DL-3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)가 함유된 100 mM Na-phosphate(pH 7.0) 용액에 겔을 넣어 반응시켰다(Mohammadi와 Kazemi, 2002).

결과 및 고찰

생육에 적당한 온도와 수분 조건으로 관리한 대조구에 비해 저온 또는 건조 처리 시 토마토 유묘의 생체중은 급격하게 감소하였다(Fig. 1). 대조구의 생체중은 일수가 경과할수록 급격하게 증가한 반면 저온 처리에서는 처리와 더불어 생육이 억제되는 경향을 보였고, 건조 처리에서는 3일 이후부터 억제되었다. 대조구의 생체중은 처리 후 12일째 37.93 g인데 비해 저온과 건조 처리에서는 각각 69.5%와 50.6% 감소하였다. 저온 또는 건조 처리 시 식물체 부위별 생체중 감소 비율은 앞은 대조구에 비해 저온 처리가 68%, 건조 처리가 55.8% 감소하였고, 줄기는 저온 처리가 74.7%, 건조 처리가 42% 감소하는 경향을 보였다. 또한 뿌리의 생체중은 대조구에 비해 저온 처리가 74.4%, 건조 처리가 51.7% 감소하였다(데이터 미제시). 이러한 결과로 보아 저온에 의한 토마토 유묘의 생육은 잎보다는 뿌리와 줄기가 더 큰 영향을 받고 건조에 의해서는 잎과 뿌리가 큰 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

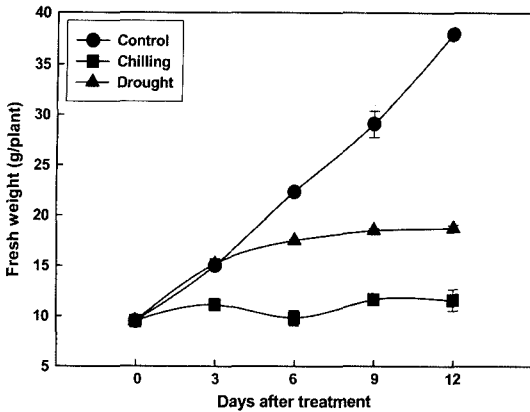


Fig. 1. Changes in fresh weight accumulation of tomato seedlings during the chilling and drought stress periods. Chilling stress was treated at 5°C with 12 hour photoperiod with 200 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ of light intensity using growth chamber for 12 days. Drought stress was treated with -50 kPa soil water potential in glasshouse at 18/25°C (night/day) for 12 days. Control seedlings were grown with -20 kPa soil water potential in glasshouse at 18/25°C (night/day) with 12 hour photoperiod for 12 days.

저온 또는 건조 처리 후 6일째의 식물체 부위별 SOD와 POD 효소의 활성을 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 전반적으로 모든 부위에서 저온 또는 건조 처리 시 대조구보다 활성이 높은 경향을 보였다. 잎의 SOD 활성은 대조구에 비해 저온과 건조 처리에서 각각 54.1%와 96.5% 증가하였고, 줄기에서는 35.8%와 46.7% 증가하여 저온처리보다는 건조처리에서 높은 경향을 보였다. 뿌리의 SOD 활성은 대조구에 비해 저온과 건조 처리에서 각각 83.1%와 60.8%가 증가하여 저온처리에서 높은 경향을 보였다.

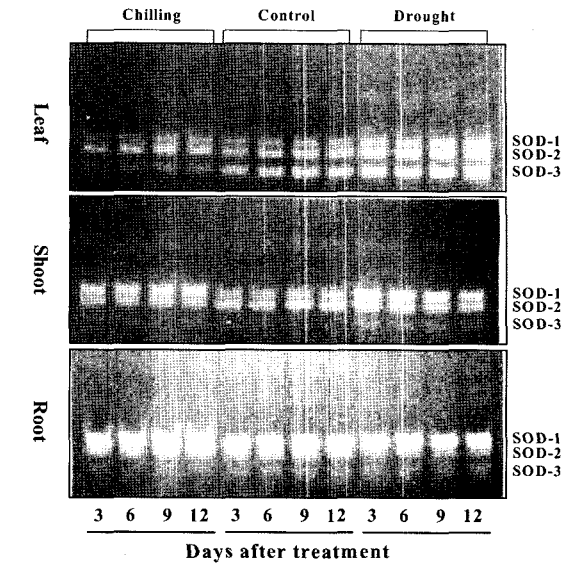
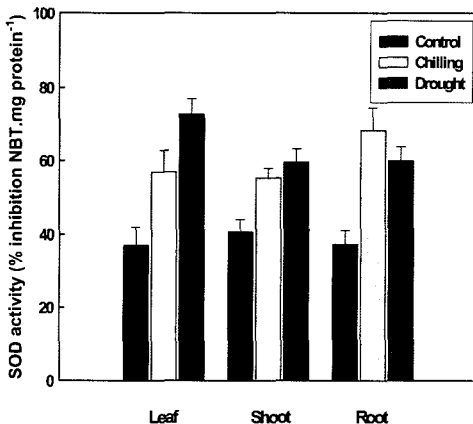


Fig. 3. Changes in the gel activities of superoxide dismutase (SOD) in tomato seedlings. Proteins were extracted from the leaves, shoots and roots of chilling-stressed and drought-stressed tomato seedlings. Electrophoresis was conducted using a 10% polyacrylamide slab gel without SDS.

잎의 POD 활성은 대조구에 비해 저온과 건조 처리에서 각각 39.6%와 81.1% 증가하였고, 줄기에서는 각각 57.4%와 106.4% 증가하여 저온 처리보다는 건조 처리에 큰 영향을 받았다. 그러나 뿌리의 POD 활성은 대조구에 비해 저온과 건조 처리에서 각각 95.0%와 52.9%가 증가하여 저온 처리에서 높은 경향을 보였다.

토마토 유묘의 부위별 SOD 동위효소 밴드 발현 양상은 Fig. 3과 같다. 잎, 줄기 및 뿌리에는 3개의 주

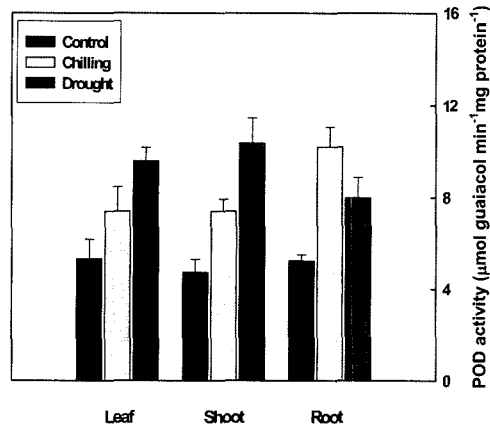


Fig. 2. Specific activities of SOD and POD in the tomato seedlings. Proteins were extracted from the leaves, shoots, and roots of chilling-stressed and drought-stressed tomato seedlings for 6 days.

토마토 유묘에 있어서 저온과 수분 스트레스에 대한 항산화효소의 활성 차이

된 SOD 밴드가 존재하였는데, 전반적으로 밴드 수의 발현 양상은 처리 간에 차이가 없었다. 그러나 처리에 따른 식물체 부위별 밴드의 활성에서 차이가 나타나 대조구보다는 저온 처리와 건조 처리에서 높은 활성을 보였다. 저온 처리한 묘의 뿌리에서는 SOD-1 밴드의 밀도가 증가하여 높은 활성을 보였고 건조 처리한 묘의 잎과 줄기에서는 SOD-3 밴드의 밀도가 증가하여 높은 활성을 보였다.

SOD는 각종 불량 환경에 의해서 과다하게 생성되어 식물 체내의 대사작용을 억제시키는 환원산소종을 과산화수소와 물로 전환시키는 효소로 환원산소종에 대한 중요한 방어기작으로 알려져 있는데, 금속 조효소의 종류에 따라 Cu/Zn-SOD, Fe-SOD 및 Mn-SOD로 구분된다(Bannister 등, 1987; Bowler 등, 1992; Gupta 등, 1993). 대부분의 원핵 생물과 진핵 생물 중에서 조류에는 Cu/Zn-SOD는 존재하지 않는 것으로 알려져 있다(Bridges와 Salin, 1981). 고등식물에서 Cu/Zn-SOD와 Mn-SOD가 존재하는데, Cu/Zn-SOD는 세포질, 엽록체, 미토콘드리아, peroxisome 및 glyoxisome 등에 존재하며(Bowler 등, 1992; Longa 등, 1994), Mn-SOD는 미토콘드리아의 matrix에 존재하는 것으로 보고되었으며(Bowler 등, 1994) Fe-SOD를 가지고 있는 것은 매우 드물다(Bannister 등, 1987). SOD의 활성증가에 의한 저온과 건조를 포함한 불량환경에 대한 내성 증진은 많은 원예작물에서 보고되었으며(Shen 등, 1999; Walker와 McKersie, 1993; Wang, 1996), 이와 같은 각종 불량 환경에 대한 SOD의 역할은 유전자 조작을 통하여 SOD의 발현을 유기함으로써 환원산소종에 의한 장애를 줄일 수 있다는 가능성도 보고되어 SOD가 각종 생리 장애에 대한 내성의 생리적 토대를 제공하고 있음이 입증되었다(Bowler 등, 1994; McKersie 등, 1993).

Fig. 4는 토마토 유묘의 부위별 POD의 발현 양상을 분석한 결과인데, 잎과 줄기에서는 각각 4개와 3개의 밴드가, 뿌리에서는 6개의 POD 밴드가 발현되었다. 전반적인 POD 밴드 수의 발현 양상은 대조구에 비해 저온 또는 건조 처리 시에는 차이가 없었지만, 밴드의 밀도에서 차이가 있었다. 저온 처리한 뿌리에서는 POD-4 밴드의 밀도가 증가하였고, 건조 처리한 잎에서는 POD-2 밴드가, 줄기에서는 POD-1과 POD-2 밴드의 밀도가 증가하여 스트레스에 따른 식물의 부위별

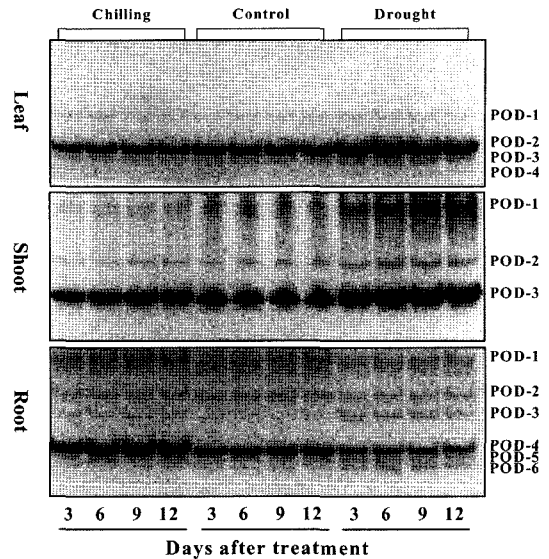


Fig. 4. Changes in the gel activities of peroxidase (POD) in tomato seedlings. Proteins were extracted from the leaves, shoots, and roots of chilling-stressed and drought-stressed tomato seedlings. Electrophoresis was conducted using a 10% polyacrylamide slab gel without SDS.

반응 차이가 있음을 알 수 있었다.

식물에 있어서 POD는 guaiacol을 전자 공여체로 사용하여 세포 내에서 조직의 리그닌화, IAA의 분해, 에틸렌 생합성 및 병에 대한 방어 등과 같은 생리적 역할을 수행하는 경우와 전자 공여체로 아스코르브산이나 시토크롬 c 등을 이용하여 세포 내에서 과산화수소의 분해에 관여하는 경우로 구분된다(Asada, 1992). 이러한 두 그룹의 POD는 분자 구조, 세포질의 존재 위치 및 그 기능이 다른 것으로 알려져 있는데, 전자의 경우 주로 세포질, 액포 및 세포벽에 위치하고 후자의 경우 엽록체와 세포질에 위치하여 기능을 수행한다(Asada, 1992; Chen과 Asada, 1989). 불량환경에 대한 식물체내 POD의 주된 역할은 SOD에 의해서 유기된 과산화수소를 물 분자와 산소 분자로 분해함으로써 과다한 활성 산소종에 의한 피해를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Anderson 등, 1995; Graham과 Patterson, 1982; Kang 등, 1998; Lee와 Lee, 2000; Salin, 1991). 본 실험의 결과에서는 대조 처리에 비해 저온 또는 건조 처리한 토마토 유묘에 있어서 POD 활성은 급격하게 증가한 양상을 보였다. 저온 또는 건조 처리 시 POD 동위효소 밴드의 밀도는 부위에 따라 다른 양상을 보였는데, 저온 처리에서는 뿌리에서,

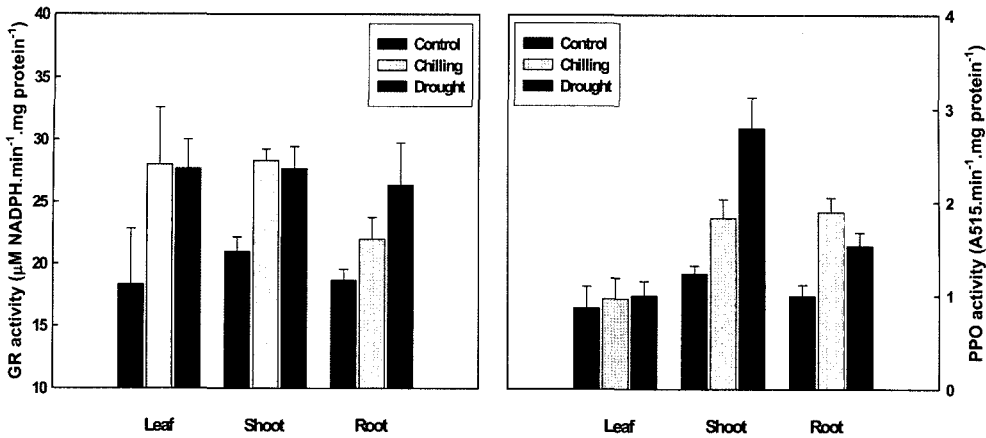


Fig. 5. Specific activities of GR and PPO in the tomato seedlings. Proteins were extracted from the leaves, shoots, and roots of chilling-stressed and drought-stressed tomato seedlings for 6 days.

건조 처리에서는 잎과 줄기에서 증가하는 양상을 보여 불량환경에 대한 방어기작으로 POD의 역할과 부위별 반응 차이를 잘 반영해 주었다.

저온 또는 건조 처리 후 6일째의 식물체 부위별 GR과 PPO 효소의 활성을 분석한 결과는 Fig. 5와 같은데, GR의 활성은 모든 부위에서 대조구보다 저온 또는 건조 처리 시 높은 활성을 보였다. 저온과 건조

처리 시 잎의 GR 활성은 대조구에 비해 각각 53.0%와 51.2% 증가하였고, 줄기에서는 각각 34.8%와 31.8% 증가하여 두 처리 간 차이는 없었다. 그러나 뿌리의 활성은 저온과 건조 처리 시 대조구에 비해 각각 18.3%와 41.4% 증가하여 건조 처리에서 높은 활성을 보였다. PPO의 활성은 저온 또는 건조 처리 시 줄기와 뿌리에서는 증가하는 경향을 보였지만, 잎에서는 대조구와 활성 차이가 없었다. 줄기의 PPO 활성은 저온 보다는 건조 처리에서 높았는데, 저온과 건조 처리 시 활성은 대조구에 비해 각각 48.8%와 127.6% 증가하였다. 뿌리에서는 줄기와 반대의 경향을 보였는데, 대조구에 비해 저온 처리에서는 90.0%, 건조 처리에서는 53.0% 증가하여 뿌리는 저온 처리에 더 큰 영향을 받는 것으로 이해되었다.

토마토 유묘의 부위별 GR의 발현 양상을 분석한 결과, 잎과 줄기에는 3개의 GR 밴드가 존재하였으며 뿌리에는 2개의 GR 밴드가 존재하였다(Fig. 6). GR 동위효소의 발현 양상은 대조구에 비해 저온 또는 건조 처리의 잎과 뿌리에서 뚜렷한 차이가 있었는데, 대조구의 잎에는 2개의 밴드가 나타난 반면 저온과 건조 처리에서는 3개의 밴드가 존재하였다. 또한 뿌리에서는 대조구에 비해 저온 또는 건조 처리에서 밴드의 밀도가 증가하여 높은 활성을 보였다. 그러나 줄기에서는 대조구와 저온 또는 건조 처리와의 밴드 발현 양상에 큰 차이가 없었다.

작물의 생육과정에 일어나는 여러 가지 대사작용에 유해한 활성산소종은 주로 항산화효소에 의해서 분해

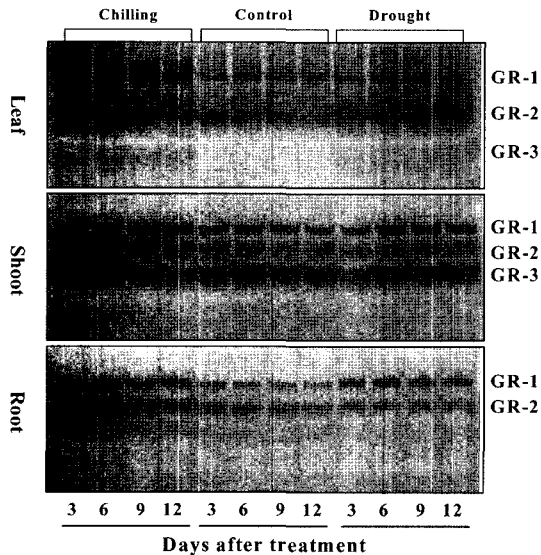


Fig. 6. Changes in the gel activities of glutathione reductase (GR) in tomato seedlings. Proteins were extracted from the leaves, shoots, and roots of chilling-stressed and drought-stressed tomato seedlings. Electrophoresis was conducted using a 10% polyacrylamide slab gel without SDS.

토마토 유묘에 있어서 저온과 수분 스트레스에 대한 항산화효소의 활성 차이

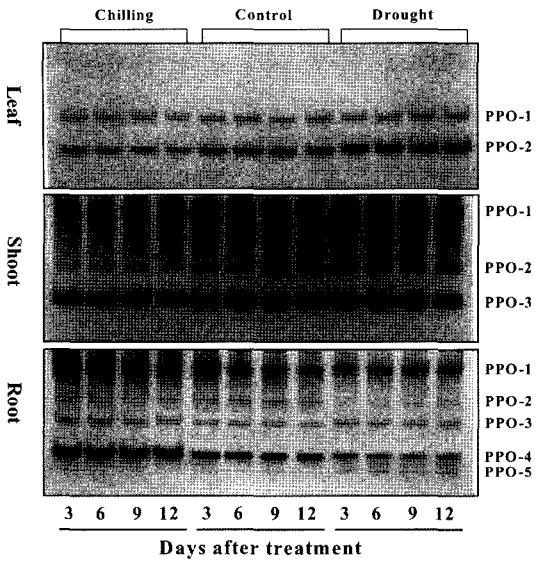


Fig. 7. Changes in the gel activities of polyphenol oxidase (PPO) in tomato seedlings. Proteins were extracted from the leaves, shoots, and roots of chilling-stressed and drought-stressed tomato seedlings. Electrophoresis was conducted using a 10% polyacrylamide slab gel without SDS.

되지만, Halliwell-Asada 경로를 통하여 아스코르브산이나 글루타티온과 같은 수용성 환원물질에 의해서 분해되기도 하는데, 이러한 과정에 요구되는 아스코르브산을 생성하는데 관여하는 것으로 알려져 있다(Foyer 등, 1991; Hauslanden과 Alscher, 1993; Horemans 등, 2000). Edwards 등(1994)은 저온에 의한 GR 효소의 활성 증가는 동위효소 밴드의 밀도 증가나 새로운 밴드의 발현과 일치한다고 하였는데, 이러한 결과는 오이 잎에서도 보고되었다(Lee와 Lee, 2000). 본 시험의 결과에서도 전반적인 GR 효소의 활성은 대조구에 비해 저온 또는 건조 처리한 식물체에서 급격하게 증가하였는데, 특히 잎에서는 대조구에 비해 저온 또는 건조 처리 시에는 GR-3의 밴드가 뚜렷하게 발현되어 불량 환경에 대한 반응 차이를 잘 반영해 주었다.

토마토 유묘의 부위에 따른 PPO 효소의 발현 양상은 뚜렷한 차이가 있었는데, 잎과 줄기에서는 각각 2개와 3개의 밴드가 존재하였고 뿌리에는 5개의 밴드가 존재하였다(Fig. 7). 저온 또는 건조 처리에 따른 부위별 활성은 줄기와 뿌리에서 차이가 있었는데, 저온 처리한 뿌리에서 PPO-1과 PPO-4의 밴드 활성이 증가하는 경향을 보였고, 건조 처리한 뿌리에서는 PPO-1

밴드의 활성이 급격하게 증가하는 경향을 보였다. 그러나 잎에서는 모든 처리에서 큰 차이가 나타나지 않았다. 식물에서 PPO는 polyphenol의 산화작용에 의해서 항균물질인 quinone의 생성과 세포막의 리그닌화에 관여하여 곰팡이병에 대한 저항성을 직접적으로 유기시키기도 하며 세포조직을 경화시켜 각종 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 것으로 알려져 있다(Mayer, 1987). 본 시험의 결과에서도 저온과 건조 처리 시 토마토 유묘의 부위에 따른 활성 차이는 있었지만 전반적으로 대조구에 비해 높은 활성을 보여 PPO도 불량 환경에 대한 반응 기작으로 작용하는 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 토마토의 경우 건조 처리 시 특히 줄기에서 PPO의 활성이 급격하게 증가한다는 Thipyapong 등(2004)의 보고와도 일치하였다.

적 요

저온 또는 건조 처리에 따른 토마토 유묘의 생육과 부위별 항산화효소의 반응 양상을 분석한 결과, 토마토 유묘의 생체중은 처리 후 12일째에 대조구에 비해 각각 69.5%와 50.6% 감소하였다. SOD와 POD의 활성은 대조구에 비해 저온 또는 건조 처리에서 높은 활성을 보였는데, 저온 처리시에는 뿌리에서 더 높은 활성을 보였고 건조 처리에서는 잎과 줄기에서 높은 활성을 보였다. 이러한 결과는 동위효소의 발현양상에서도 일치하였다. GR의 활성은 저온 또는 건조 처리시 대조구보다 높은 활성을 보였는데, 잎과 줄기에서는 저온과 건조 처리간의 차이는 없었지만, 뿌리에서는 건조 처리가 높은 경향을 보였다. GR 동위효소 발현양상은 저온과 건조처리시에는 GR-3 밴드가 잎에서는 발현되어 대조구와 차이가 있었지만, 줄기와 뿌리에서는 큰 차이가 없었다. PPO 활성은 잎에서는 모든 처리에서 차이가 없었지만, 줄기와 뿌리에서는 저온 또는 건조 처리에서 대조구보다 높은 경향을 보였다. 특히 줄기의 PPO 활성은 저온 처리보다 건조처리에서 높았고 뿌리의 PPO 활성은 건조 처리보다 저온 처리에서 높았다. 동위효소의 발현양상에서도 건조처리에서는 줄기에서, 저온 처리에서는 뿌리에서 높은 밀도를 보여 불량 환경에 따른 부위별 반응 차이를 잘 반영해 주었다.

주제어 : 건조, 저온, 토마토, GR, POD, PPO, SOD

인 용 문 헌

1. Anderson, M.D., T.K. Prasad, and C.R. Stewart. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109:1247-1257.
2. Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase: A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85:235-241.
3. Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts. Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:601-639.
4. Asada, K., M. Takahashi, and M. Nagate. 1974. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agr. Biol. Chem.* 38:471-473.
5. Bannister, J.V., W.H. Bannister, and G. Rotilio. 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 111-180.
6. Beyer, W.F. and I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161:559-566.
7. Bowler, C., M. Van Montagu, and D. Inze. 1992. Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
8. Bowler, C., W. Van Camp, M. Van Montagu, and D. Inze. 1994. Superoxide dismutase in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 13:199-218.
9. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
10. Bridges, S.M. and M.L. Salin. 1981. Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol.* 68:275-278.
11. Chen, G.X. and K. Asada. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* 30:987-998.
12. Davies, K.J.A. 1995. Oxidative stress: The paradox of aerobic life, pp. 1-32. In: C. Rice-Evans, B. Halliwell, and G.G. Lunt (eds.). *Free radicals and oxidative stress: Environment, drugs, and food additives.* Biochem. Soc. Symp. 61, Portland Press, London, UK.
13. Edwards E.A., C. Enard, G.P. Creissen, and K.J. Mulinieux. 1994. Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta.* 192:137-143.
14. Elstner, E.F. 1987. Metabolism of activated oxygen species, pp. 253-315. In: D.D. Davies (ed.). *Biochemistry of metabolism: The biochemistry of plants.* Vol. II. Academic Press, New York, NY, USA.
15. Foyer, C.F. 1993. Ascorbic acid, pp. 31-58. In: R.G. Alscher and J.L. Hess (eds.). *Antioxidants in higher plants,* CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
16. Foyer, C.F., M. Lelandais, C. Galap, and K.J. Kunert. 1991. Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol.* 97:863-872.
17. Graham, D. and B.D. Patterson. 1982. Responses of plants to low non-freezing temperatures: Proteins, metabolism, and acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:347-372.
18. Gupta, A.S., J.L. Heinen, A.S. Holaday, J.J. Burke, and R.D. Allen. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:1629-1633.
19. Hauslanden, A. and R.G. Alscher. 1993. Glutathione, In: R.G. Alscher and J.L. Hess. Eds, *Antioxidants in higher plants.* CRC Press, London. pp. 1-30.
20. Heath, R.L. 1987. The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Adv. Phytochem.* 21:29-54.
21. Horemans, N., C.H. Foyer, G. Potters, and H. Asard. 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38:531-540.
22. Kang, K.S., C.J. Lim, T.J. Han, J.C. Kim, and C.D. Jin. 1998. Activation of ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* leaves in responses to aminotriazol. *J. Plant Biol.* 41:155-161.
23. Kendall, E.J. and B.D. McKersie. 1989. Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat. *Physiol. Plant.* 76:86-94.
24. Lee, D.H. and C.B. Lee. 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: In gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159:75-85.
25. Longa, M.A., L.A. del Rio, and J.M. Palma. 1994. Superoxide dismutase of chestnut leaves, *Castanea sativa*: Characterization and study of their involvement in natural leaf senescence. *Physiol. Plant.* 92: 227-232.
26. Mayer, A.M. 1987. Polyphenol oxidase in plants-recent progress. *Phytochemistry.* 26:11-20.
27. McKersie, B.D., Y.R. Chen, M. de Beus, S.R. Bowler, D. Inze, K. Halluin, and J. Botterman. 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103:1155-1163.
28. Mohammadi, M. and H. Kazemi. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant*

토마토 유묘에 있어서 저온과 수분 스트레스에 대한 항산화효소의 활성 차이

- Sci. 162:491-498.
29. Monk, L.S., K.V. Fagerstedt, and R.M.M. Crawford. 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant* 76: 456-459.
 30. Olson, P.D. and J.E. Varner. 1993. Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J.* 4:887-892.
 31. Putter, J. 1974. Peroxidases, pp. 685-690. In: H.U. Bergmeyer (Ed.). *Methods of enzymatic analysis* 2. Academic Press, NY, USA.
 32. Rao, M.V., G. Paliyath, and D.P. Ormrod. 1996. Ultra-violet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110:125-136.
 33. Salin, M.L. 1991. Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13:851-858.
 34. Shen, W., K. Nada, and S. Tachibana. 1999. Effect of cold treatment on enzymic and nonenzymic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68:967-973.
 35. Sommer, A., E. Neeman, J.C. Steffens, A.M. Mayer, and E. Harel. 1994. Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 105:1301-1311.
 36. Thipyapong, P., J. Melkonian, D.W. Wolfe, and J.C. Steffens. 2004. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Sci.* 167: 693-703.
 37. Walker, M.A. and B.D. McKersie. 1993. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *J. Plant Physiol.* 141:234-239.
 38. Wang, C.Y. 1996. Temperature preconditioning affects ascorbate antioxidant system in chilled zucchini squash. *Postharvest Biol. Technol.* 8:29-36.