

稻熱病에 感染된 벼의 葉組織에서 Peroxidase의 活性

朴元穆 · 李鎔世 · 朴相鎬

高麗大學校 農科大學 植物保護學科

Peroxidase Activity in Leaf Tissue of Rice Infected by *Pyricularia oryzae*

Won Mok Park, Yong Se Lee and Sang Ho Park

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Korea University, Seoul 132, Korea

要 約

水稻品種 농백, 진흥, 낙동, 태백 등 4品種과 稻熱病菌 KJ-101과 KJ-301의 2 race를 使用하여 peroxidase 活性增加와 抵抗性과의 關係를 관찰하였다. peroxidase 活性은 水稻幼苗가 成長할 수록 모든 品種에서 增加되는 傾向은 있었으나 品種間 차이는 크지 않았다. 稻熱病菌을 接種 後 時間이 경과함에 따라 罹病 葉에서는 無接種 健全葉보다 酵素活性이 높았고 特히 接種된 菌株에 非親和的인 品種보다 發病이 심한 親和的인 品種에서 더욱 높았다. 電氣泳動法에 의한 peroxidase pattern은 罹病 葉에서는 稻熱病菌의 peroxidase band를 관찰할 수 없었다. 窒素施肥量을 增加시켰을 지라도 peroxidase 活性은 變함이 없었다.

ABSTRACT

The present researches were carried out to investigate the peroxidase activity in association with the reactions of the 4 cultivars of rice plant, Nagdong, Jinheung, Nongbaek and Taebak to *Pyricularia oryzae* race KJ-101 and KJ-301. Although the peroxidase activity was increased during the growth of the rice seedlings, the significant difference in the activity was not found among 4 cultivars. After inoculation of the fungus, the peroxidase activity was enhanced in diseased leaves, being considerably higher in the compatible than in the incompatible cultivars. The isozyme bands of peroxidases observed in mycelium of rice blast fungus were not found in the diseased leaves on the gel electrophoresis. The peroxidase activity was not affected by the increased application of nitrogenous fertilizer.

Key words: peroxidase, *Pyricularia oryzae*, resistance.

緒 論

植物이 病原菌에 感染되면 여러 가지 生化學的인 變化를 가져온다. 그 중에서 特히 peroxidase의 活性變化가 현저하다.

이에 대하여 peroxidase가 病抵抗性과 관련이 있는 ethylene, lignin, phytoalexin의 形成에 參與할 뿐만

아니라 페놀化合物을 산화시켜 quinone으로 變化시켜 病原菌의 확산을 막는다는 것이 담배(14), 高구마(18) 토마토(12), 오이(3) 등에서 發見되어 많은 研究가 抵抗性發現과 관련지어져 行해져 왔다. 또한 peroxidase는 病原菌이 分泌하는 毒素을 산화하여 不活性化시킴으로써 病의 進展을 막는다고 하였다(9).

이와 反面에 一般的으로 peroxidase는 病菌의 侵入뿐만 아니라 植物이 生理的인 여러 가지 장애 즉 機

械적인 상처, 重金屬, 건조 및 냉害 등을 받았을 때도 활성이 증가하고 병원菌 侵入과는 관계없이 作物의 種類 및 品種에 따라서도 활성이 다르기 때문에 病抵抗性과 관련이 없다는 報告도 있다(7, 13).

벼에 있어서도 Iwata 等(5)은 peroxidase의 活性增加가 稻熱病에 對한 抵抗性과 관련이 있다고 報告하였으며 Matsuyama 等(10)은 관계가 없다고 報告하였다.

따라서 本 實驗은 벼에서 peroxidase의 活性變化가 稻熱病에 對한 抵抗性과 관련이 있는지 혹은 단지 稻熱病菌의 侵入에 따른 生理的인 變化에 의한 것인가를 밝히고자 實施하였다.

材料 및 方法

供試品種 및 栽培方法. 本 實驗에 使用한 品種은 태백, 낙동, 진흥, 농백 등 4品種을 使用하였다.

벼의 育苗은 plastic pot (15×5×10cm)에 N:P:K = 0.5g : 0.5g : 0.2g을 基肥로 사용하여 20粒씩 播種하여 18日 後 6葉期에 實驗材料로 使用하였다.

窒素肥料의 배비구는 窒素만 3배, 5배로 증식하여 基肥로 하였다.

稻熱病菌 및 接種方法. 稻熱病菌은 농백, 진흥, 낙동에 親和性이 있고 태백에 非親和性인 KJ-101 race와 태백, 농백에 非親和性이 있는 KJ-301 race를 使用하였다.

稻熱病菌은 oatsmeal 한천배양기가 담긴 petri dish에서 27°C에서 7日間 배양 後 기준균사를 除去한 다음 27°C에서 형광등을 48時間 조사하여 孢子를 形成시켰다. 여기에 0.2% Tween 20을 첨가한 殺菌水를 使用하여 포자현탁액을 만들었다. 이 포자현탁액(현미경 10×10배 시야당 30개 포자)을 6엽기의 幼苗에 분무접종하였다. 接種된 植物은 26°C, 관계습도가 100%인 접종상에서 24時間 습실처리 後 27°C의 재배상에서 生育시켰으며 대조구는 稻熱病菌만을 接種하지 않고 同一한 조건하에서 키운 幼苗를 使用하였다. 病發生 정도는 接種 5日 後 最上葉인 6葉을 James (6)의 方法을 利用하여 測定하였다.

酵素活性測定. Peroxidase 活性은 接種 직전과 接種 後 1日부터 1日 간격으로 5日까지 제 6葉을 취하여 아래와 같이 측정하였다.

酵素 추출은 잎 3개당 5ml의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)을 첨가하여 4°C에서 유발을 使用 마쇄 後 이것을 냉동원심분리기에서 12,000g 로 4°C에서 30分間 원심분리 後 상등액을 취하였다.

이 추출액 0.01ml를 peroxidase assay mixture (guaiacol 1 ml, 1% H₂O₂ 10 ml, 0.1 M acetate buffer pH 5.2 470 ml) 5ml에 넣어 28°C의 온수조에 정치시켜 500 nm에서 60초간 반응한 吸光度를 測定하여 다음과 같이 측정하였다(5).

$$\text{specific activity} = \frac{\Delta \text{O.D.} \times 1000}{\text{protein (mg)}}$$

Protein 含量은 Lowry 方法에 의해서 測定하였다(8). 電氣泳動法. 電氣泳動法에 使用한 sample은 잎 3개당 5ml의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)을 첨가하여 4°C에서 유발을 使用 마쇄하였고, 稻熱病菌은 Czapeck dox medium에 28°C에서 3주간 배양 後 büchner funnel에서 Whatman No. 3 여과지로 걸렀다.

이 菌體를 같은 비율(w/v)의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)을 첨가하여 4°C에서 유발을 使用하여 마쇄하였다.

이들 각 sample은 냉동원심분리기에서 12,000g 로 4°C에서 30分間 원심분리 後 상등액을 취하였다.

6% polyacrylamide slab gel을 Panta phor System(15)으로 使用하였다. continuous system으로 gel buffer와 tray buffer는 0.125 M Tris-borate (pH 8.9)를 使用하였다. Solt 당 sample 100 μl (100 μg의 protein 量에 해당)을 넣었다. 電氣泳動은 400V에서 2時間하였다. 電氣泳動 後 gel을 benzidin과 과산화수소수 혼합용액에 넣어 peroxidase 만을 發色시켰다(ii)

結 果

品種別 發病 정도. 水稻 稻熱病 發生의 品種間 차이를 보면 표 1과 같다.

KJ-101에 의한 品種間 罹病率은 낙동, 진흥, 농백이 각각 3.8%, 1.3%, 1.1%를 보여 感受性反應은

Table 1. Percentage of diseased leaf area and reactions of the 6th leaves of 4 rice cultivars at the six-leaf stage 5 days after inoculation with *Pyricularia oryzae* races KJ-101 and KJ-301

| Cultivar | Diseased leaf area (%) | |
|----------|---------------------------|---------------------------|
| | KJ-101 | KJ-301 |
| Nagdong | 3.8±0.6 ^a (HS) | 1.2±0.5 (HS) ^b |
| Jinheung | 1.3±0.6 (HS) | 1.2±0.7 (HS) |
| Nongbaek | 1.1±0.4 (HS) | 0 (HR) |
| Taebaek | 0 (HR) | 0 (HR) |

^a Each value is a mean ± one standard deviation of 30 replicate diseased leaves.

^b HS: highly susceptible, HR: highly resistant.

보인 반면 태백은 病이 發生되지 않아 抵抗性反應을 보였다. 또한 KJ-301 race에 대해서는 낙동, 진흥이 1.2%, 1.2%의 病發生率을 보여 감수성 반응을 나타냈고 농백과 태백은 저항성 반응인 병이 전혀 발생되지 않았다.

窒素肥料를 증시한 낙동에서는 病發生이 增加하였으나 태백에서는 病을 유발시키지 못하였다.

Peroxidase 活性. 태백과 낙동에 病菌을 接種하지 않은 健全잎에서는 peroxidase 活性은 一般적으로 낙동이 태백보다 높았고 時間이 경과할수록 增加되는 경향은 있었으나 큰 차이가 없었다. KJ-101과 KJ-301 2race를 接種했을 때는 接種後 1日부터 感受性品種인 낙동의 罹病잎에서의 酵素活性은 健全잎에 비해 급격히 증가하였으나 태백은 酵素活性이 높지 않았다(그림 1).

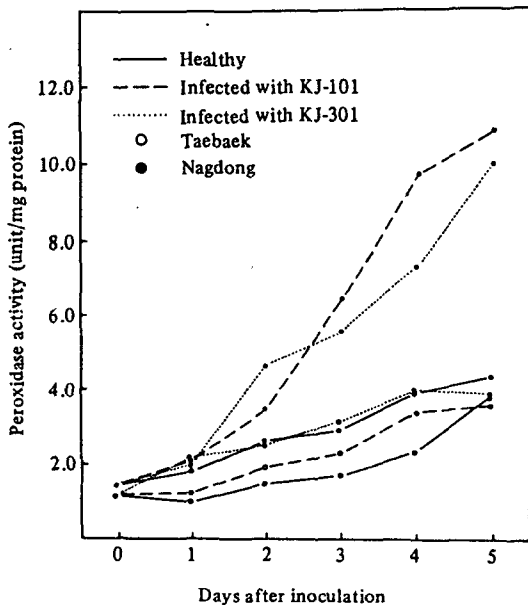


Fig. 1. Changes in peroxidase activities in the 6th healthy and infected leaves of rice cultivars (Nagdong = susceptible, Taebaek = resistant) at the six-leaf stage.

진흥과 농백에 病菌을 接種하지 않은 健全잎에서는 peroxidase 活性이 品種間 큰 차이가 없었다.

농백에 KJ-101을 接種했을 때는 感受性反應을 보여 酵素活性이 급격히 增加하였으나 KJ-301을 接種했을 때는 酵素活性이 큰 차이가 없었고 태백에 2race를 接種했을 때는 peroxidase 活性變化가 無接種 잎에 비해 높지 않았다(그림 2).

發病된 잎에서 peroxidase 活性이 病原菌 peroxidase

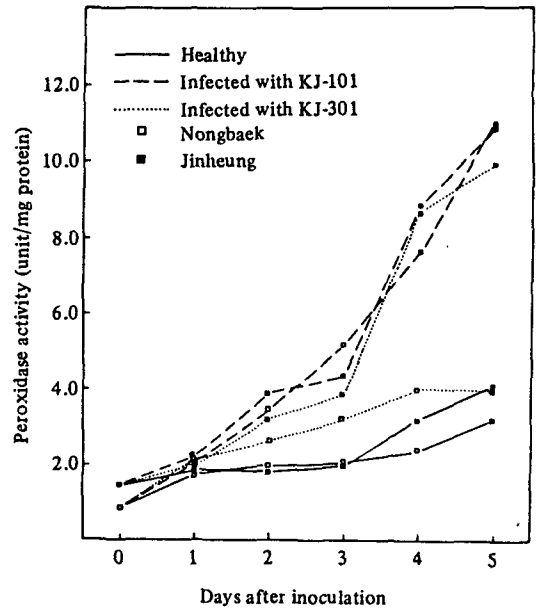


Fig. 2. Changes in peroxidase activities in the 6th healthy and infected leaves of rice cultivars (Jinheung = susceptible, Nongbaek=resistant) at the six-leaf stage.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Fig. 3. Patterns of peroxidase isozymes from the 6th healthy, diseased leaves of rice cultivars at the six-leaf stage and mycelium of *Pyricularia oryzae*. 1. Nagdong, healthy leaves, 2. Nagdong, leaves inoculated with KJ-101 race, 3. Mycelium of KJ-101 race, 4. Nagdong, leaves inoculated with KJ-301 race, 5. Mycelium of KJ-301 race, 6. Jinheung, healthy leaves, 7. Jinheung, leaves inoculated with KJ-101 race, 8. Mycelium of KJ-101 race, 9. Jinheung, leaves inoculated with KJ-301 race, 10. Mycelium of KJ-301 race.

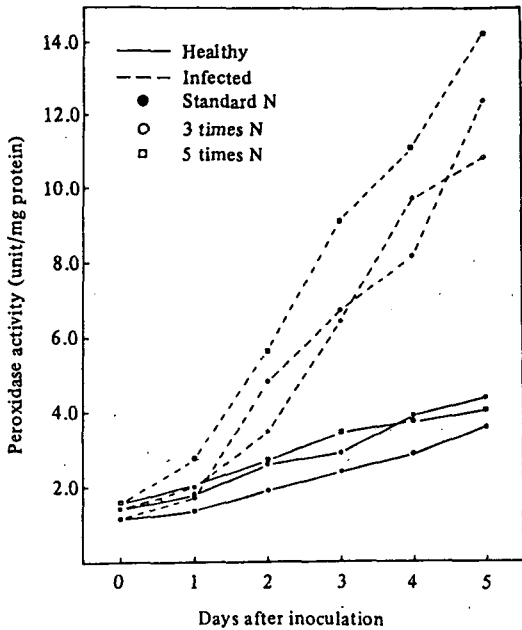


Fig. 4. Changes in peroxidase activities in the 6th healthy and infected rice leaves (Nagdong = Susceptible) with *Pyricularia oryzae* KJ-101 at the six-leaf stage grown in different leaves of nitrogen fertilizer.

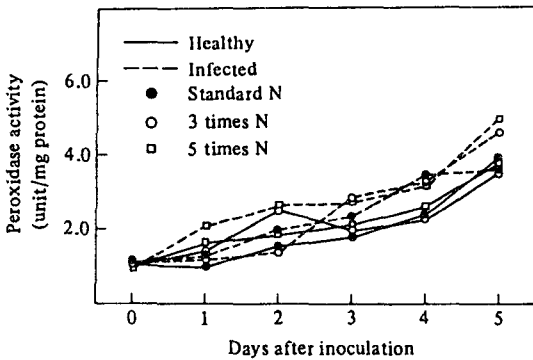


Fig. 5. Changes in peroxidase activities in the 6th healthy and infected rice leaves (Taebaek = resistant) with *Pyricularia oryzae* KJ-101 at the six-leaf stage grown in different levels of nitrogen fertilizer.

에 의한 것인지 혹은 植物이 生産한 것인지 를 조사하기 위하여 電氣泳動法을 利用하여 진전일, 이병일과 稻熱病菌 菌絲에서 채취한 peroxidase pattern 을 비교한 결과 稻熱病菌의 peroxidase band 를罹病잎에서는 발견할 수 없었다. 稻熱病菌의 isozyme band 는 Rf 0.1 에 나타난 반면罹病잎과 健全잎에서는 Rf 0.09, 0.13, 0.25, 0.39, 0.44 에서 나타났다(그림 3).

窒素施肥量이 많아질수록 稻熱病 發生率이 높아지므로 질소시비수준과 peroxidase 活性이 관련이 있는지 알아보았다.

낙동과 태백 재배시 窒素施肥量 표준량(0.5g/pot), 3 배량 및 5 배량으로 한 다음 KJ-101을 接種後 酵素活性을 5日間 毎日 측정하였다.

낙동에서 健全한 잎에서는 5일까지 peroxidase 活性은 질소시비수준에 따라 큰 차이가 없었고 반면 KJ-101로 接種된 잎에서는 peroxidase 活性이 1일부터 현저히 增加하였으나 질소시비수준간에는 큰 차이가 없었다(그림 4).

태백에 非親和的 관계인 KJ-101을 接種後 peroxidase 活性은 無接種 健全한 잎이나 큰 차이가 없었고 질소시비수준간에도 큰 차이가 없었다(그림 5).

考 察

稻熱病菌을 接種後 品種間 차이를 알아본 결과 낙백, 진흥, 낙동은 KJ-101 race 에 親和的 現象을 보였으며 KJ-301 race 는 진흥과 낙동에 親和性이 있었다.

Peroxidase 活性은 健全잎에서는 品種間 차이가 없었으나罹病잎에서는 健全잎보다 酵素活性이 높았다.

벼에 親和的 관계인 稻熱病菌을 接種하여 peroxidase 活性을 측정해 본 결과 一般的으로 peroxidase 活性은 非親和性品種보다 親和性品種이 더 높게 나타났다.

Matsuyama 等(10)은 稻熱病菌과 非親和的 조합에서 酵素의 活性이 24時間 내에 높게 나타난 반면 親和的 조합에서는 적게 나타났으나, 接種後 3~5日내에 親和的 조합에서 非親和的 조합보다 酵素活性이 급격히 增加하였다고 했다. 이는 本 實驗과 일치한다. 만약에 peroxidase 가 벼의 稻熱病에 대한 抵抗성과 관련이 있다면 親和的 조합보다 非親和的 조합의 接種 잎에서 本 酵素의 活性이 增加되어야 하겠는데 本 實驗 결과 病發生이 심하게 진전된 親和的 조합 接種 잎에서 peroxidase 活性이 높은 것은 病原菌의 침입과 정작 과정 중 植物 조직과 細胞의 괴사에 따른 生理 生化學的인 변화로 酵素活性의 增加가 이루어진 것으로 간주된다.

Peroxidase 는 온도, 상처, 증금속 등에 의해서도 그 活性이 달라지며, Benedict (1)는 酵素의 조성과 活性은 病原菌의 침입에 의한 특이적 반응이라기보다는 內外部의인 환경의 영향에 의해 植物細胞의 대사작용이 변한 것이라고 보고한 바 있다.

Seevers 等(13)도 peroxidase 가 밑에서 줄기 녹병

에 대한 批抗性과 관계없음을 보고하였다.

Bireka 등(2)은 고구마잎에 기계적인 상처를 주면 isoperoxidase 의 質的인 변화는 없지만 어린 잎에서는 급격히 活性이 增加한다고 하였고 Wagih 등(16, 17)은 참두와 오이에 manitol-osmotic stress 를 가해도 virus 의 감염과 같이 peroxidase 의 質的, 量的 變化가 일어난다고 하였다.

發病된 잎에서 增加된 peroxidase 는 기주 혹은 病原菌 중 어느 편이 만들었냐에 對하여 두 가지로 가정할 수 있다. 첫째로, 發病된 잎에서 조직의 상처로 인하여 植物體가 本 酵素를 더 많이 만든다는 것과 두 번째로는 病原菌이 發病植物 조직 내에서 증식하여 만들 수 있으므로 發病된 잎에서 本 酵素는 病原菌에서 기인할 수 있다는 것이다. 이를 밝히기 위하여 電氣泳動法을 使用하여 peroxidase 의 pattern 을 관찰한 결과 罹病잎에서는 稻熱病의 peroxidase band 를 관찰할 수 없었다. 따라서 病든 조직내의 本 酵素는 기주에 의해서 만들어짐을 추정할 수 있다.

窒素肥料을 증시하면 稻熱病發生이 조장되기 때문에 질소시비수준과 peroxidase 活性이 病抵抗性和 관련이 있는지 알아 보았다. 窒素肥 를 표준구보다 3배 5배를 증시한 결과 施肥量에 따라 稻熱病發生率은 현저히 增加되었으나 peroxidase 活性에는 차이가 없었다. 즉, 窒素를 많이 施肥하여 發生이 심하게 된 잎이나 표준시비하여 發病이 그보다 가벼웠던 잎에서도 peroxidase 活性은 큰 차이가 없었다.

따라서 本 實驗을 통해 病든 잎조직 내의 peroxidase 活性增加는 식물조직이 病原菌의 침입에 따른 조직손상의 결과로 일어나며 病抵抗性과는 아무런 관계가 없으며 질소비료의 시비정도에 따라 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

1. BENEDICT, W. G. (1971). Effect of intensity and quality of light on peroxidase activity associated with *Septoria* leaf spot of tomato. *Can. J. Botany* 49:1721-1726.
2. BIRECKA, H. & CATALFAMO, J. (1976). Cell isoperoxidase in sweet potato plants in relation to mechanical injury and ethylene. *Plant Physiol.* 57:74-79.
3. HAMMERSCHMIDT, R., NUCKLES, E. M. & KUĆ, F. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Collectotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.* 20:73-82.
4. HAMMERSCHMIDT, R. & KUĆ, J. (1980). Enhanced peroxidase activity and lignification in the induced systemic protection of cucumber. *Phytopathology* 70:689.
5. IWATA, M., SUZUKI, Y., WATANABE, T., MASE, S. & SEKIZAWA, Y. (1980). Effect of probenazole on the activities of enzymes related to the resistant reaction in rice plant. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46:297-306.
6. JAMES, W. C. (1971). *A manual of assessment keys for plant disease*. Canada Department of Agriculture Publication No. 1458.
7. JENNINGS, P. H., BRANNAMAN, B. L. & ZCHEILE, JR., F. P. (1969). Peroxidase and polyphenol oxidase activity associated with *Helmithosporium* leaf spot of maize. *Phytopathology* 59:963-967.
8. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & PADALL, R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
9. MACKO, V., WOODBURY, W. & STAHMANN, M. A. (1968). The effect of peroxidase on the germination and growth of mycelium of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 58: 1250-1254.
10. MATSUYAMA, N. & KOZAKA, T. (1981). Increase of peroxidase activity unrelated with resistance to rice blast disease. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 47:654-661.
11. PARK, W. M., KO, Y. H., YOO, Y. J. & LEE, J. Y. (1982). The change of peroxidase activity in soybean seed followed by infection with *Cercospora kikuchii*. *Korean J. Plant Prot.* 21:23-26.
12. RETING, N. (1974). Changes in peroxidase and polyphenoloxidase associated with naturium and induced resistance of tomato to *Fusarium* wilt. *Physiol. Plant Pathol.* 4:145-150.
13. SEEVERS, P. M. & DALY, J. M. (1970). Studies on wheat stem rust resistance controlled at the Sr6 locus. 1. The role of phenolic compounds. *Phytopathology* 60:1322-1328.
14. SIMONS, J. & ROSS, A. F. (1970). Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensi-

- tive tobacco. *Phytopathology* 60:383-384.
15. STEGEMANN, H., BURGEMISTER, W., FRANCKSEN, H. & KROGERRECKLENFORT, E. (1985). Gel electrophoresis and Isoelectric focusing. Chapter 3. Standard Electrophoresis (PAGE). Institut für Biochemie, Biologische Bundesanstalt, Messeweg 11 D-3300 Braunschweig (West Germany).
16. WAGIH, E. E. & COUTTS, R. H. A. (1982). Peroxidase, polyphenoloxidase and ribonuclease in tobacco necrosis virus-infected or manitol osmotically-stressed cowpea and cucumber tissue. 1. Quantitative alteration. *Phytopath. Z.* 104:1-12.
17. WAGIH, E. E. & COUTTS, R. H. A. (1982). Peroxidase, polyphenoloxidase and ribonuclease in tobacco necrosis virus-infected or manitol osmotically-stressed cowpea and cucumber tissue. 11. Qualitative alteration. *Phytopath. Z.* 104:124-137.
18. WEBER, D. J., CLARE, B. & STAHRMAN, M. A. (1967). Enzymic changes associated with induced and natural resistance of sweet potato to *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 57:421-424.