

방사선과 염화제2수은이 자주달개비 분홍돌연변이에 미치는 영향

Combined Effects of Mercury Chloride and Radiation evaluated by
Tradescantia stamen hair Assay

김진규, 이병현, 노철아
한국원자력연구소
대전시 유성구 덕진동 150

신해식, 이진홍
충남대학교
대전시 유성구 궁동 220

요 약

수은이온은 식물의 생장을 억제하고, 식물의 광합성 과정 및 막구조에 있어서 다른 중금속의 이온들보다 억제효과가 큰 것으로 알려졌다. 무기수은제인 염화제2수은 ($HgCl_2$)은 농약으로서 살충제의 용도로 사용되고 살충력이 강하면서 작물에 대한 약해도 큰 것으로 보고 되었다. 자주달개비 수술털의 선단 세포는 분열능력이 있어서 발생 또는 분열과정중 화학물질이나 방사선에 노출되면 꽃잎과 수술털의 전체 또는 일부분이 분홍빛으로 체세포 돌연변이를 일으킨다. 이러한 자주달개비 수술털 시스템은 중금속을 비롯한 다양한 화학물질에 매우 민감하기 때문에 이를 생물말단 점으로 이용한 다양한 평가법에 적용되고 있다. 본 실험에서는 염화제2수은의 농도에 따른 분홍돌연변이율의 변화를 실험을 통하여 확인해 보고자 하였다. 분홍돌연변이는 1 Gy이하의 선량영역에서 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타내었으며, 염화제2수은이 5 μM 이하의 농도에서는 자주달개비 분홍돌연변이율의 감소를 유발하였으며, 10 μM 이상의 농도에서는 분홍돌연변이율에 아무런 영향도 주지 않았다. 또한 염화제2수은만의 처리는 분홍돌연변이율에 유의성있는 영향이 나타나지 않았다. 본 연구결과를 통해 볼 때 자주달개비 수술털분석 시스템은 중금속을 비롯한 미량으로 존재하는 환경유해물질의 생물학적 위해도에 대한 평가에 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

Abstract

This study deals with the combined effect of radiation with mercuric chloride on *Tradescantia* somatic cell pink mutation. *Tradescantia* BNL 4430 was used as an experimental material. The somatic cell of *Tradescantia* are very sensitive to chemical toxicants or ionizing radiation, and thus can be used as a biological end-point assessing their effect. One group was irradiated with gamma-ray after mercuric chloride treatment. Mercuric chloride treatment did not affect the flower bud development in the range of experimental concentration. The other group was irradiated with gamma-ray without pretreatment of mercuric chloride. Pink mutation frequencies were analyzed using pooled data during the peak interval. Each group included four parallel series of experimental units using four gamma-ray doses of 0.2, 0.5, 0.8 and 1 Gy. Pink mutation frequencies showed a good dose-response relationship for radiation. Linear regression analysis of the gamma-ray data of pink mutation frequencies yielded a correlation coefficient of 0.97. *Tradescantia* somatic pink mutation frequencies irradiated with gamma-ray after mercuric chloride treatment decreased at concentrations of 0.01, 0.5, 1, 5 μM . The frequencies of somatic cell pink mutation did not differ significantly from each other in the experimental units pretreated with mercuric chloride in a concentration of 10, 20, 30, 40, 50, 60 or 70 μM . The pink mutation frequency for mercuric chloride and radiation group yields 3.51 ± 0.49 , 2.88 ± 0.51 , 4.19 ± 0.54 and 4.11 ± 0.63 pink mutation/100 hairs for 0.01, 0.5, 1, 5 μM and 5.78 ± 0.50 , 4.80 ± 0.39 , 5.82 ± 0.56 , 6.16 ± 0.38 , 4.71 ± 0.57 , 5.19 ± 0.53 and 5.01 ± 0.35 pink mutation/100 hairs for 10~70 μM . Through this results, it is suggested that mercuric chloride at a low concentration decreases somatic cell pink mutation induced by gamma-ray.

1. 서 론

다양한 환경요인과 화학물질로 인하여 식물체의 생장억제 및 광합성 기구의 변화에 대한 연구는 식물자원의 보호 및 식량증산의 차원에서 중요하다. 공업 용수나 농약 등에 함유된 중금속 이온들은 일차적으로 담수나 해수에 녹아들어가 일차 생산자인 고등식물과 해산 및 담수 조류에 흡수되며 [1], 더 나아가 다음 단계의 포식자들에게 농축되어 환경 보호 또는 식량 자원 보존의 차원에서 심각한 문제로 대두되고 있다. 수은은 비교적 일찍부터 인류가 사용해온 중금속의 하나로서 이노제, 설사제, 매독치료제 등의 의학분야와 농업 및 산업분야에서도 광범위하게 사용되고

있으나 그 독성에 대해서는 1950년대 일본에서 발생한 Minamata 병이 보고된 이후 세계 각처에서 무기 및 유기수은의 중독사고가 발생하자 관심이 고조되기 시작하였다 [2]. 수은에 관한 연구는 주로 임상적인 면에서 기질적 기능적 장애와 더불어 환경 및 생물체내에서의 축적정도 및 영향에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔으며 [3], 수은이온은 생물체에 필수적인 미량원소가 아니나 식물의 생장을 억제하고, 식물의 광합성 과정 및 막구조에 있어서 아연이나 구리 이온보다 억제효과가 큰 것으로 알려졌다 [4]. 특히, 무기수은과 메틸수은은 갑상선 종양과 신장부의 종양증가 등이 보고 되었으며, 미국환경청 (EPA)에서 인간 발암성이 가능한 Group C로 분류하였다. 무기수은제인 염화제2수은 ($HgCl_2$)은 농약으로서 살충제의 용도로 사용되고 있다. 특히, 염화제2수은은 살충력이 강하면서 작물에 대한 약해도 큰데 유제나 분제로 사용되고 있으며, 농작물중에서 농축되어 그것을 취식한 인간의 체내에 다시 농축되므로 주의해야한다. 식물체에 대한 대부분의 중금속들의 억제 효과는 여러 작용부위에서 복잡한 기작을 통하여 일어난다. 식물체의 다양한 영향 중에서도 염화제2수은의 농도에 따른 식물체의 체세포돌연변이에 미치는 유전적인 손상영향을 조사하고자 하였다. 본 연구에 사용된 자주달개비 수술털의 선단세포는 분열능력이 있어서 발생 또는 분열과정중 방사선 등의 돌연변이원에 피폭되면 민감하게 체세포 돌연변이를 일으킨다. 자주달개비는 꽃색의 표현형이 자주색으로 화서 (inflorescence)의 발생 또는 수술털 세포의 분열과정 중에 방사선을 포함한 돌연변이원이나 화학적 발암원에 노출될 경우 민감하게 체세포 돌연변이를 일으킨다. 남색 표현형과 관련이 있는 유전자가 방사선에 의해 손상을 받으면 수술털 세포의 표현형이 분홍색 또는 무색으로 바뀌게 된다. 이와 같은 자주달개비 중간잡종 클론의 생물학적 특이성을 실험상의 이론적 기반으로 다양한 응용연구가 진행되어 왔으나 [5-7], 소독제나 농약으로 사용되는 승홍이 방사선과 함께 자주달개비의 수술털 세포계에 미치는 복합적 영향을 연구한 사례는 없다. 따라서 본 연구에서는 자주달개비 수술털 세포계에 의한 방사선의 선량-반응 규명외에 방사선에 의하여 유발되는 자주달개비 수술털 분홍돌연변이 빈도가 염화제2수은의 농도에 따라 어떻게 달라지는지를 실험적으로 확인하고자하였다.

2. 재료 및 방법

공시재료 : 실험용 식물체는 방사선에 민감하게 반응하면서도 자발돌연변이율이 비교적 낮은 *Tradescantia* 4430 클론을 사용하였다. 온실에서 건전하게 생육된 화서를 절취하여 실험군별로 15개 이상 (>200화기)을 성장상 (growth chamber)에서 24시간 순치시킨 다음 실험에 사용하였다.

방사선 조사 : 방사선원은 ^{60}Co (선원강도 약 150 TBq, Panoramic Irradiator,

Atomic Energy of Canada Ltd.)을 이용하였고, 절취화서 (cuttings)가 시드는 것을 방지하기 위해 줄기가 양액에 침지된 상태로 공기중에서 0.2, 0.5, 0.8 및 1 Gy를 조사하였다. 방사선 조사가 끝난 화서는 새로운 Hougland's solution No.2 6배 희석액 [8]에 침지하여 생육상내에서 두고 폭기를 실시하였다.

염화제2수은(HgCl₂)처리: 염화제2수은(Mercury chloride, 승홍, FW:271.52, Sigma Co.)는 수용액에서는 불용성이기 때문에 에탄올에 용해시킨 다음 1%의 처리액으로 희석하여 0.01~5 μ M의 4개 농도와 10~70 μ M의 7개 농도로 희석하여 사용하였다. 순치되어 있던 절취화서를 각각의 농도별로 화서당 10 μ l(한쪽의 포엽에 5 μ l)씩 마이크로 피펫을 이용하여 화아에 처리하였다. 처리군은 침지한 다음 폭기(aeration)를 실시하였다. 6시간 후 방사선을 조사하였다.

식물체 배양 : 염화제2수은 (HgCl₂)의 처리 및 방사선을 조사한 절취화서는 생장상내에서 배양하였으며, Hougland's solution No.2 6배 희석액을 3일에 한번씩 공급하여 주었다. 방사선만 조사한 실험군과 염화제2수은의 처리 후 방사선을 조사한 실험군의 배양조건은 명기 14시간, 20°C, 습도 80%, 조도는 290 μ mole/m²/sec, 암기 10시간, 18°C, 상대습도 85%로 동일한 조건을 유지하였다.

검경 분석 : 돌연변이는 실체현미경을 이용하여 배율 25배 하에서 계수하였다. 만개상태의 화기를 실험군별로 채화한 다음 6개의 수술을 모두 떼어내 과라핀유가 도말된 슬라이드상에 펴서 검경용 프레파라트를 제작하였다. 돌연변이는 한 개 또는 다수의 연속된 분홍세포군 각각을 하나의 돌연변이 건 (event)수로 계수 하였다. 돌연변이 세포, 수술털 수 및 수술털 세포수의 계수는 방사선 조사 후 4주 이상 지속적으로 실시되었다. 특히 방사선 조사 후 분홍돌연변이율 증가가 두드러진 고조기간 (peak interval)의 검경결과를 통합한 자료 (pooled data)로부터 분홍돌연변이빈도 (pink mutations/100hairs)를 산정하였으며 방사선을 조사하지 않은 대조시료의 분홍돌연변이율을 보정자료로 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

선량-반응관계 (dose-response relationship)

일반적으로 방사선 및 독성물질에 의한 돌연변이, 염색체 이상 또는 종양유발 등의 생물학적 효과를 간단한 선형적-이차함수적 선량반응관계로 표현하기도 한다. 이와 같은 linear-quadratic dose-response의 경우도 선량포화가 나타나지 않는 저선량 영역에서는 선량의 제공이 곱해지는 이차함수항이 생물학적 효과에 미치는 기여분은 무시될 수 있는 수준이기 때문에 저선량 영역에 있어서의 반응관계는 단순

한 일차함수로 표현할 수 있다. 이와 같이 일차함수로 선량-반응관계를 나타내는 것이 타당함은 이미 여러 연구보고를 통해 잘 입증된 사실이다 [9, 10]. 방사선에 의하여 자주달개비 수술털 세포에 유발되는 각종 돌연변이는 방사선 조사 후 날짜가 경과함에 따라 점차 증가하여 최대값에 이르렀다가 다시 감소하여 자발돌연변이율까지 낮아지는 포물선의 양상을 나타낸다. 방사선 조사실험군에 있어서 0.2, 0.5, 0.8 및 1 Gy 조사군에 대하여 방사선에 의한 분홍돌연변이율의 증가는 조사 후 7일 경부터 증가하기 시작하여 조사 후 8일과 10일 쯤 사이에 각각 1.29 ± 0.22 , 4.0 ± 0.75 , 6.41 ± 0.23 , 6.46 ± 0.12 의 최대값을 나타내었다. 방사선을 조사한 네 실험군 모두가 분홍돌연변이가 증가하는 시기와 분홍돌연변이 최대값을 나타내는 시기에 있어서 커다란 차이 없이 유사하게 나타났다. 돌연변이율 고조기간은 통상 방사선 조사 후 6일에서 20일 사이에 나타나지만 공시식물체의 생육상태 및 실험처리시의 손상정도에 따라 약간 다르게 나타날 수도 있으나 본 실험에서는 네 실험군 모두 통상적인 고조기간내에 돌연변이율이 증가하였다. 일반적으로 분석결과의 통계적 오차와 분산을 최소화하기 위하여 돌연변이율이 최대값에 이르는 날짜를 중심으로 일정한 기간을 고조기간 (peak interval)으로 설정하여 이때의 돌연변이율 검경결과를 통합하여 데이터 (pooled data)로 활용한다. 본 실험에서 분홍돌연변이가 확연하게 증가한 고조기간은 7일부터 11일까지로 설정하였다. 네 조사실험군에 있어서 방사선량의 증가에 따른 분홍돌연변이의 증가는 뚜렷한 일차함수적 선량-반응 관계를 나타내고 있다 (Fig. 1). 이와 같은 선형 관계식의 회귀계수는 0.97로서 높은 통계적 유의성이 인정된다.

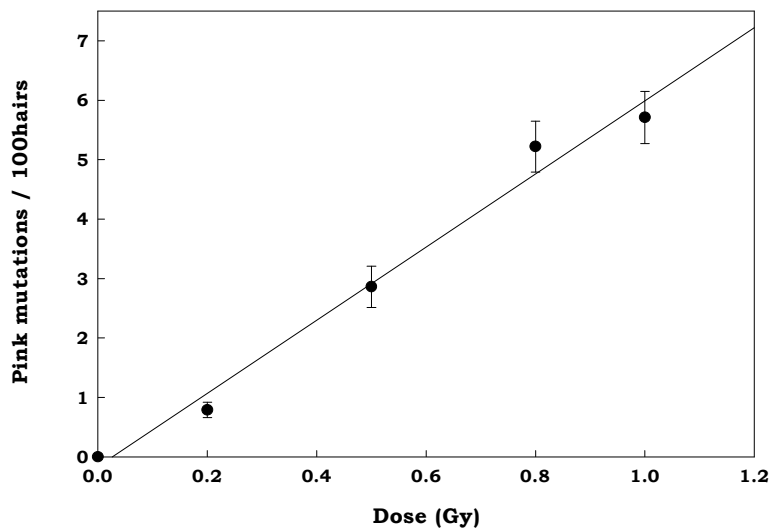


Fig. 1. Dose-response relationships of pink mutation frequencies induced in stamen hairs of the *Tradescantia*

염화제2수은 (mercury chloride, HgCl₂)

본 실험에서 분홍돌연변이가 확연하게 증가한 고조기간은 7일부터 11일까지로 설정하였다. 일정한 선량(1 Gy)하에서 염화제2수은이 자주달개비 분홍돌연변이율에 미치는 영향을 분석하였다. 염화제2수은의 농도 0.01, 0.5, 1, 5 μ M를 처리한 후 방사선을 조사한 결과 고조기간동안 분홍돌연변이율의 최대값은 각각 6.07 ± 0.40 , 5.76 ± 0.97 , 7.48 ± 1.17 , 7.67 ± 0.68 을 나타내었다. 고조기간의 검경결과를 통합하여 데이터로 환산한 결과는 방사선만을 조사한 실험군(1 Gy)의 분홍돌연변이율의 값 5.71 ± 0.44 와는 차이가 있었다. 염화제2수은의 농도 0.01 μ M부터 5 μ M에서는 방사선에 의한 분홍돌연변이율 증가가 억제되었다. 특히 0.5 μ M의 농도에서는 2.88 ± 0.51 로서 최저값을 나타내었다 (Fig. 2). 반면에 10 μ M농도 이상에서는 염화제2수은의 농도가 방사선에 의한 분홍돌연변이율의 증가나 감소에 영향을 미치지 못했음을 실험을 통하여 확인할 수 있었다. 즉 방사선에 의한 분홍돌연변이율은 5.71 ± 0.44 이었으며, 10 μ M부터 70 μ M까지의 분홍돌연변이율은 유의성 있는 증가나 감소가 나타나지 않았다. 염화제2수은은 방사선과 복합적으로 작용하였을 때 10 μ M이하의 저농도에서 분홍돌연변이율의 억제를 유발하나 그 이상에서는 분홍돌연변이의 유발에 어떠한 영향도 미치지 않았다는 사실을 확인할 수 있었다.

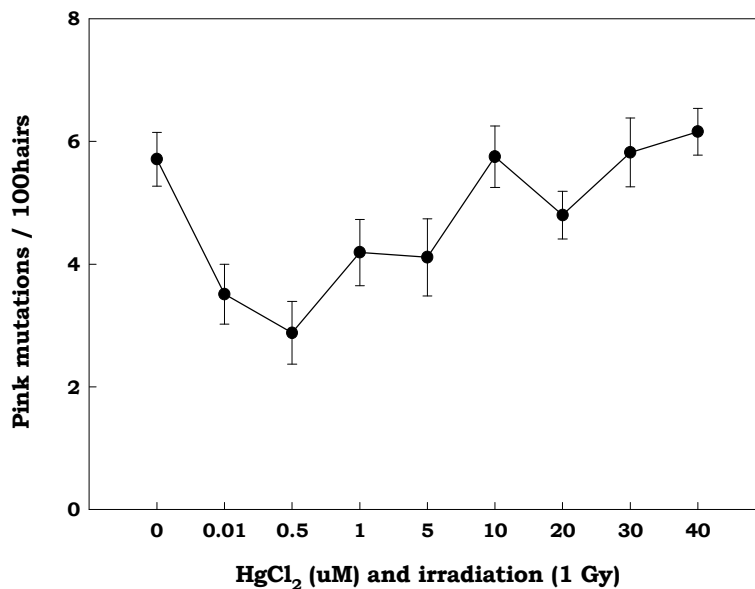


Fig. 2. Gamma-irradiation induced pink mutation frequencies in *Tradescantia* 4430 pretreated with mercuric chloride.

방사선 조사 및 염화제2수은에 의한 개화수의 변화

방사선 조사 후 개화된 전체적인 꽃수에 있어서 방사선만을 조사한 실험군의 경우 선량의 증가에 따라 뚜렷하게 감소하는 경향을 나타낸 반면 0.5, 1 μM 의 염화제2수은처리 후 방사선을 조사한 실험군은 다른 실험군과는 달리 지속적인 개화가 이루어 졌다. 다른 실험군과 비교하였을 때 0.5~5 μM 의 염화제2수은의 농도는 방사선의 분홍돌연변이유발에 영향을 미치고 있는 것으로 판단된다 (Fig. 3). 염화제2수은의 농도 0.01 μM 의 처리 후 방사선을 조사한 후 실험군만 어느 정도의 차이가 있었을 뿐 다른 모든 실험군은 개화의 지속과 함께 개화한 화기수가 방사선만을 조사한 실험군과 비교할 때 개화의 지속성과 개화수에서 보다 높았다 (Fig. 3). 염화제2수은만을 처리한 실험군에서의 개화수는 방사선을 처리한 실험군에 비하여 개화가 지속적으로 이루어 졌다는 점을 감안할 때 염화제2수은이 자주달개비의 개화에 직접적으로 영향을 미치지 않았음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 또한 식물체 생육의 연주기 (annual cycle) 특성상 춘계에 생성되는 화서는 10~15개의 화아를 가지고 있는 화서를 사용하였기 때문에 상대적으로 화아의 수가 빈약한 하계나 추계의 화서보다 성장발육이 정상적으로 이루어 졌을 것으로 판단되며 민감도 또한 높을 것으로 생각한다.

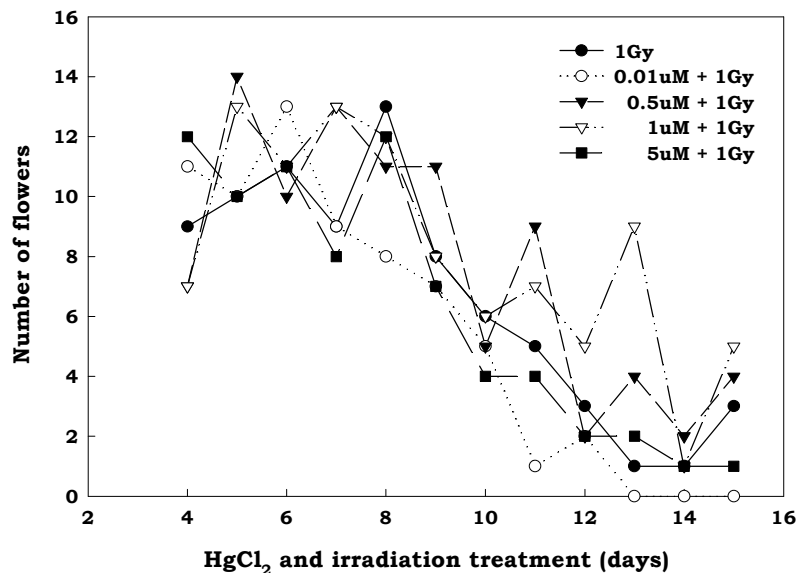


Fig. 3. Changes in the number of flowers after the combined treatment of radiation with mercuric chloride.

4. 결 론

무기수은제인 염화제2수은은 농약으로서 살충제의 용도로 사용되고 있다. 특히, 염화제2수은은 살충력이 강하면서 작물에 대한 약해도 크며, 유제나 분제로 사용되고 있다. 수은이온은 생물체에 필수적인 미량원소가 아니나 식물의 생장을 억제하고, 식물의 광합성 과정 및 막구조에 있어서 아연이나 구리 이온보다 억제효과가 큰 것으로 알려져 있다. 자주달개비 수술털은 꽃색의 이형성에 의하여 실제로 사람이 환경에서 접하게 되는 낮은 준위의 이온화방사선과 다양한 화학 물질의 유전적 효과를 감지하는 데 가장 적합한 실험재료의 하나로 사용된다 [11]. 방사선에 의한 자주달개비의 분홍돌연변이율은 선량에 따라 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타내었다. 선형 관계식의 회귀계수는 0.97로서 높은 통계적 유의성이 인정된다. 염화제2수은에 의한 자주달개비 분홍돌연변이유발은 농도에 따라 다른 결과를 나타내었다. 특히 5 μM 농도 이하에서는 전체적으로 방사선(1 Gy)만을 조사한 실험군과 비교할 때 낮은 분홍돌연변이율을 나타내었다. 0.5 μM 의 농도에서는 2.88 ± 0.51 로서 최저값을 나타내었다 그러나 10 μM 농도 이상에서는 염화제2수은의 농도에 따른 증가나 감소의 반응이 나타나지 않았다. 이는 염화제2수은의 10 μM 이상의 농도에서는 방사선에 의한 자주달개비의 분홍돌연변이율에 영향을 주지 않는다는 것을 실험을 통하여 확인하였다. 방사선만을 조사한 실험군보다 염화제2수은과 방사선을 조사한 실험군이 화아의 개화가 지속적으로 이루어 졌으며, 개화수가 많았다. 자주달개비의 분홍돌연변이율을 통하여 승홍의 농도에 의한 식물체의 다양한 영향중에서도 염화제2수은의 농도에 따라 체세포돌연변이에 미치는 유전적인 손상영향에 민감하게 반응한다는 사실을 확인하였다.

본 연구에서는 염화제2수은과 방사선에 의하여 유발되는 자주달개비 분홍돌연변이 빈도의 선량-반응 관계를 통하여 자주달개비 수술털 분석법의 돌연변이원에 대한 민감도를 확인하였다. 그 결과를 통하여 볼 때 살충제와 농약으로 사용되는 염화제2수은에 의한 생물학적 영향을 검색하는데 유용한 접근법의 생물학적 모델로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 특정연구사업의 일환으로 수행되었습니다.

5. 참고문헌

1. F. Dietz, "The enrichment of heavy metals in submerged plants", In, *Advances in water pollution research*, Pergamon, New York, 53-62, (1972)
2. P. B. Hammond and R. P. Beliles, "Metals. In: J. Doull, C. D. Klassen and Amdur, M. O., Casarett and Doull's Toxicology. 2nd ed., Macmillan Publishing Co. Inc. New York, 421-435, (1980)
3. H. Rustam, R. V. Burg, and S. E, "Evidence for a neuromuscular disorder in methylmercury poisoning. *Arch. Environ. Health*. 30, 190-195 (1975).
4. B. Y. Moon, H. S. Jun, C.-H. Lee, and C. B. Lee, "Mercury-specific effects on photosynthetic apparatus of barley chloroplasts compared with copper and zinc ions" *J. Korean Environ. Sci. Soc.* 1, 1-11 (1992).
5. T. Gichner, J. Veleninsky, and A. G. Underbrink, "Induction of somatic mutations by the promutagen dimethylnitrosoamine in hairs of *Tradescantia* stamen" *Mutat. Res.* 78, 381-384 (1980).
6. J. K. Kim, W. R. Kim, Y. K. Lee, J. S. Kim, H. S. Song, C. Y. Jeong, K. N. Kim, and K. P. Hong, "Monitoring of environmental radiation using *Tradescantia* bioindicator" *Kor. J. Environ. Biol.* 16, 85-91 (1998).
7. S. Ichikawa, H. Kanai, and H. Harada, "Somatic mutation frequencies in *Tradescantia* stamen hairs treated with aqueous solutions of ethyl methanesulfonate and methyl methanesulfonate" *Jpn. J. Genet.* 65, 309-321 (1990).
8. A. Conger, "A simple liquid-culture method of growing plants" *Proc. Florida State Horticultural Society*, 77, 3-6 (1964)
9. 김진규, 김원록, 김재성, 신해식, 이정주. "기온일교차와 감마선의 영향에 의한 자주달개비 수술털의 체세포돌연변이 빈도" *환경생물학회지*, vol. 16, 253-262 (1998).
10. A. Cebulska-Wasilewska, K. Rekas and J. K. Kim. "Application of TSH bioindicator for studying the biological efficiency of radiation" *Nukleonika*, 44, 15-30 (1999).
11. S. Ichikawa and C. Ishii, "Validity of simplified scoring methods of somatic mutations in *Tradescantia* Stamen hairs" *Environ. exp. Bot.* 31, 247-252 (1991).