

참박의 생장 및 효소와 광합성 활성에 미치는 저선량 γ 선의 조사 효과

Effects of Low Dose Gamma Radiation on the Growth, Enzyme and Photosynthetic Activities of Gourd (*Lagenaria siceraria*)

김재성, 백명화, 이해연, 이영근

한국원자력연구소
대전시 유성구 덕진동 150

요 약

저선량 방사선 조사가 참박의 초기생육과 생리활성에 미치는 효과를 알아보기로 참박종자에 저선량 γ 선을 0~20 Gy 수준으로 조사하여 관찰한 결과는 다음과 같다. 저선량에 의한 참박의 초기생육은 4~16 Gy에서 다소 증가하였고, 생육조사시 측정된 자엽의 catalase와 peroxidase 활성은 대조구에 비해 8 Gy에서 가장 높았으며 본엽의 peroxidase 활성은 4 Gy에서 확연히 증가하였다.

저선량 조사한 박 식물체의 광 스트레스에 대한 내성효과 조사에서는, 광계II의 광화학적 효율은 광 스트레스 처리 4시간 후 50% 정도 감소되는 경향을 보인 반면 F_0 는 거의 변화가 없었으며, 저선량 4 Gy 조사구 잎의 F_v/F_m 값이 대조구에 비해 8% 정도 덜 감소한 것으로 나타났다. 광계II의 광양자 수율, Φ_{PSII} 과 광계II 반응중심의 흥분 포획능 또한 광 억제가 진행되는 동안 감소하는 경향을 보였으며, 특히 흥분 포획능은 4 Gy 조사구가 광스트레스에 덜 민감한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 저선량 방사선 조사가 광합성 기구의 광보호 능력을 증가시켜 박 식물체의 생리, 생화적인 변화와 광 스트레스에 대한 내성 증가에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

ABSTRACT

Gourd seeds were irradiated with the doses of 0~20 Gy to investigate the effect of the low dose gamma radiation on the early growth and physiological activity. The stimulating effects of the low dose gamma radiation on the early growth were not noticeably high, but were increased generally 4~16 Gy irradiation group. The catalase and peroxidase activity of cotyledon from seeds irradiated with gamma radiation were increased at 8 Gy irradiation group and peroxidase activity of leaf was noticeably high at 4 Gy irradiation group.

The photochemical yield of PSII, estimated as F_v/F_m , was decreased with increasing illumination time by 50% after 4 hours while F_0 did not change. Interestingly, F_v/F_m in plants of 4 Gy irradiation group was decreased less showing 40% of inhibition after 4 hr,

indicating that the low dose gamma radiation increased resistance of plants to photoinhibition. Changes in the effective quantum yield of PSII(1-F/Fm'), Φ_{PSII} and 1/Fo-1/Fm, a measure of the rate constant of excitation trapping by the PSII reaction center, showed similar pattern as Fv/Fm. These results showed the positive effect of low dose gamma radiation on the seedling growth or physiological activities gourd via increasing photoprotective capacities of photosynthetic apparatus.

서 론

인구증가에 따른 식량 수요를 충족시키기 위해서는 고갈되어 가는 유전자원과 현재의 농경법으로는 한계가 있다. 따라서 이를 해결하기 위한 획기적인 식량 생산 방법이 필요하며 또한 농업 생산성 향상 및 종자의 발아력 향상과 건전한 생육을 위한 기술이 매우 필요하다. 이온화 방사선은 이것이 발견된 후 짧은 시간 내 식물에 자극작용이 있는 것으로 알려져 있는데 이온화 방사선의 종류에 상관없이 거의 비슷한 생물학적 영향을 보여주며 계통발생을 통해서 생물은 저선량 방사선에 자극받아 발아, 출아, 성장과 발육의 촉진, 수량구성요소의 증가 등이 식물에서 관찰되었다[1, 2]. 채소원예작물에서는 상당한 변이를 보여주고 있으나 배추, 무, 고추, 박 등에서 발아증가와 생육촉진 및 수량증가 등 농업적 가치가 있는 것이 많이 보고되어있다[3, 4]. 이외에도 당근의 광합성과 핵산 합성 증가[5], 참박의 peroxidase, catalase 활성증가[4], 겨자의 호흡, catalase 활성, vitamin C와 질소 함량 증가[6], 대두의 산성비[7], 고추의 역병[8], 토마토와 대두의 후숙고선량에 대한 저항성 증가[9, 10]등이 보고되어있다. 이에 본 실험에서는 저선량 방사선이 참박의 초기생육과 조사식물체의 생리활성 및 광 스트레스에 대한 영향 등에 미치는 효과를 조사하고자 온실실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료 : 시험용 참박 종자로는 농우바이오에서 99년 인도에서 시판용 종자로 생산한 OK 품종 (*Lagenaria siceraria*)을 분양받아 사용하였다.

방사선 조사 : 한국원자력연구소에서 보유중인 저준위조사시설 (^{60}Co)을 이용하여 γ 선 0, 1, 2, 4, 8, 16, 20 Gy 7수준으로 건조종자에 직접 조사하였다. 조사선량율은 Fricke dosimeter로 측정하였다.

온실재배실험 : 방사선 조사 다음날 종자 100립을 배양토와 모래가 1:1로 충전된 15cm pot에 10립씩 10반복으로 파종하여 유리온실에서 발아시켜 파종 7일 후에 발아율을 조사하고 11일 후엔 자엽장과 자엽폭을, 18일 후엔 초장을 조사하였다.

조효소액 추출 : 파종 11일 후와 18일 후의 생육 조사 시 각각 자엽과 제 2본엽 0.3 g씩을 액체 질소를 사용하여 얼린 다음 막자사발에서 마쇄한 후 0.05 M 인산완충액 (pH 7.0) 0.6 ml을 첨가한 다음 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준단백질로 사용한 Bradford의 방법에 따라 측정하였다[11].

효소 활성 측정 : Peroxidase 활성은 pyrogallol을 기질로 사용한 방법에 따라 측정하였는데, 조효소액 100 μl 를 3 ml cuvette에 넣고 0.1 M 인산완충액 (pH 6.0) 0.32 ml, 0.147 M H_2O_2 0.16 ml, 5% pyrogallol 용액 0.32 ml과 증류수 2.1 ml을 함께 섞은 후, 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하여 구하였다. 또한 Catalase 활성은 기질인 H_2O_2 의 감소량을 측정하는 방법을 사

용하였는데 효소측정을 위한 반응용액은 0.053 M H₂O₂ 1 ml, 효소액 0.1 ml, 0.05 M 인산완충액 (pH 7.0) 1.9 ml의 혼합액으로 하여 240 nm에서 흡광도 감소를 1분간 측정하였다[12].

광역제 처리 : 일정한 온도 (25°C)를 유지할 수 있는 아크릴통에 증류수를 넣은 후 원모양의 잎절편을 띄워 900 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광에 노출시켰다. 광처리로 인한 열을 차단하기 위하여 수돗물이 흐르는 원통형의 유리 수조 (Φ 15 cm, 높이 15.5 cm)를 아크릴통 위에 올려 놓았다. 광역제 처리를 위한 광원으로는 텅스텐 할로겐 램프(ITAMI PROTEX CO. LTD., JAPAN)를 사용하였다.

실온 엽록소 형광 측정 : 광계II에 의한 엽록소 형광 유도는 Xe-PAM flurometer (Heinz Walz, Effeltrich, Germany)를 이용하여 측정하였다. 광역제 유도 후 잎절편을 잎 디스크 전극 chamber 안에서 30분 동안 암적응 시켰다. 일정 형광 측정광은 Xenon-Measuring Flash Lamp를 통하여 조사하였고, actinic light와 Saturation light으로는 Main control unit에 의해 조절되는 Actinic-/Saturation Light Unit (XE-AL)을 통하여 조사하였다. 엽록소 형광 소산은 actinic light 조건에서 잎절편이 지속적으로 광합성을 수행하는 동안 포화광을 조사하여 분석하였다. 비광화학 소산 계수는 Schreiber 등의 정의에 따라 계산하였다[13].

$$\text{NPQ(nonphotochemical quenching)} = (\text{Fm}-\text{Fm}')/\text{Fm}'$$

$$\Phi_{\text{PSII}} = (\text{Fm}'-\text{F})/\text{Fm}'$$

엽록소 정량 : 25 mM HEPES가 들어있는 80% 아세톤 buffer를 사용하여 잎으로부터 엽록소를 추출하였고 Porra 등의 방법에 의하여 총 엽록소량을 계산하였다[11].

$$\text{Chls a + b} = 19.54\text{A}_{646.6} + 8.29\text{A}_{663.6}$$

결과 및 고찰

1. 저선량 조사한 참박의 초기생육과 효소활성

수박 대목으로 사용되는 OK 참박 품종 종자에 저선량 γ 선을 조사하고 온실재배하며 생육을 관찰한 결과 (Table 1), 파종 7일 후에 조사한 발아율은 대조구 70.0%에 비해 2 Gy와 20 Gy에서 각각 76.0%와 74.0%로 약 6~9% 증가하였으나 다른 저선량 조사구는 대조구와 비슷한 발아율을 보였다. 파종 11일 후 자엽장과 자엽폭 관찰 시, 자엽장은 대조구 5.36 cm에 비해 1~16 Gy 조사구에서 1~4% 정도 증가하였는데 특히 8 Gy에서 5.59 cm로 가장 높았고 자엽폭은 8 Gy와 16 Gy에서 대조구 3.09 cm에 비해 4% 증가한 3.20 cm를 나타내어 자엽생육 관찰시 저선량 조사구에서 대조구에 비해 뚜렷한 증가효과는 보이지 않았으나 대체로 4~16 Gy 조사구에서 양호한 생육양상을 나타내었다. 파종 18일 후 조사한 초장은 대조구 13.8 cm에 비해 모든 저선량 조사구에서 별다른 증가효과를 보이지 않았다.

파종 11일 후에 참박의 자엽 생육 조사시 대조구에 비해 생육이 높았던 4 Gy와 8 Gy 조사구의 자엽을 채취하여 단백질과 효소활성을 측정한 결과는 다음과 같다. 자엽의 단백질 함량은 대조구 3.98 mg/g에 비해 4 Gy와 8 Gy에서 별다른 증가효과를 보이지 않았으나 (Fig. 1a), 효소활성에서는 저선량 조사구에서 높은 활성을 보였는데 catalase 활성은 대조구 0.78 unit에 비해 4 Gy와 8 Gy에서 각각 0.81 unit와 0.87 unit로 3~11% 증가하였으며 (Fig. 1b), peroxidase 활성도 4 Gy와 8 Gy에서 대조구 1.99 unit에 비해 12~15% 증가하여 각각 2.23 unit와 2.29 unit의 활성을 보였다 (Fig. 1c). 파종 18일 후에 2분엽에서 단백질과 효소활성을 측정한 결과, 단백질 함량과 catalase 활성은 대조구에 비해 별다른 증가효과를 보이지 않았으나 (Fig 2a, b), peroxidase 활성은 대조구 1.94 unit에 비해 4 Gy와 8 Gy에서 각각 2.50 unit와 2.28 unit로 17~29% 증가하였다.

2. 저선량 방사선이 조사된 박의 광억제 현상과 광합성

자연상태에서 재배되는 작물은 다양한 환경 스트레스를 경험하게 되는데 이중 광 스트레스는 가장 흔히 일어날 수 있는 스트레스 중의 하나이다. 따라서 본 실험에서는 저선량 방사선이 조사된 박의 광 스트레스에 대한 내성 변화를 엽록소 형광 분석을 통하여 조사하였다.

일반적으로 F_0 와 F_v/F_m 은 광계 II의 활성을 나타내주는 지표로 사용되고 있는데[14, 15], 즉 F_0 는 색소 수준에서 광계II의 구조적인 변화, F_v/F_m 는 광계II의 들뜬 에너지 포획능력을 나타내준다 [16]. 그림 3에서 보는바와 같이 광억제가 진행됨에 따라 F_v/F_m 이 감소되는 경향을 보이며 4시간 처리시 50%의 감소를 볼 수 있었다. 특히 4 Gy의 저선량 방사선이 조사된 박의 경우 대조구에 비해 광 스트레스에 대해 덜 민감한 것으로 나타났다. 한편, F_0 는 광억제가 진행됨에 따라 약간의 증가를 보였으나 대조구나 저선량 방사선이 조사된 박 사이의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다 (Fig. 3a). 광계II의 광양자 수율을 나타내주는 Φ_{PSII} 과 광계II 반응중심에 의한 흥분 포획률을 나타내주는 $1/F_0-1/F_m$ 또한 광억제가 진행됨에 따라 감소되는 경향을 보였으며 저선량 4 Gy가 조사된 박의 경우 광 스트레스에 대해 덜 민감하게 반응하는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 이러한 결과로써 저선량 방사선 조사에 의해 박의 내성이 증가한 것을 알 수 있었다. 틸라코이드막을 가로 질러 형성되는 ΔpH 와 밀접한 관련이 있는 비광화학적 소산인 NPQ는 광억제가 진행됨에 따라 감소되는 경향을 보였으나 대조구와 저선량 방사선이 조사된 박사이에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 따라서 저선량 방사선 조사가 ΔpH 에 의한 에너지 분배 양상에는 영향을 미치지 않는 것으로 보였다. 한편, 엽록소 함량은 저선량 방사선 조사에 의해 약간의 감소를 보였으나 광억제 처리에 의해서는 큰 변화를 보이지 않았다 (Table 2).

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음

참고문헌

1. Kim, J. S. and Y. B. Lee. Ionizing radiation hormesis in crops. Korean J. of Environ. Agri. 17(1):76-85(1998).
2. Luckey, T. D. Hormesis with ionizing radiation. CRC press. Inc. Boca Raton. Fla.(1980).
3. Izvorska, N. The gamma ray effect on the growth, productivity and some biochemical changes of pepper. Inst. Fiziol. Rast. Bulg. Akad. Nauk., 18:79-83(1973).
4. Kim, J. S., Y. K. Lee, H. S. Park, M. H. Back and K. H. Chung. Effects of low dose gamma radiation on the early growth and physiological activity of gourd (*Lagenaria leucantha* L.). Korean J. of Environ. Agri. 19(2):142-146(2000).
5. Vlasyuk, P. A. Effect of ionizing radiation on the physiological-biochemical properties and metabolism of agricultural plants. Inst. Fiziol. Biokhim. Rast. SSR. 24-31(1964).
6. Garg, C. K., B. Tirwari and O. Singh. Effect of presowing gamma irradiated seeds in relation to the germination behavior of Indian colza (*Brassica campestris* L. var. Sarson Prain). Indian J. Agric. Sci., 42:553(1972).
7. Kim, J. S., E. K. Lee, Y. K. Lee and Y. B. Lee. Influence of artificial acid rain on the growth of soybean irradiated with low dose gamma radiation. Korean J. of Environ. Agri.

- 18(3):245-249(1999) .
8. Kim, J. S., E. K. Lee, J. Y. Song, H. G. Kim and Y. B. Lee. Induction of resistance against *Plytophthora Blight* of pepper by low dose gamma ray radiation. Korean J. of Environ. Bio. 18(1):47-51(2000).
 9. Kim, J. S., J. K. Kim, M. H. Back and D. H. Kim. Effects of low dose γ -ray on the early growth of tomato and the resistance to subsequent high doses of radiation. Korean J. of Asso. Radiat. Prot. 24(3):123-129(1999).
 10. Kim, J. S., S. K. Chae, M. H. Back and D. H. Kim. Effects of low dose γ radiation on the radiosensitivity of soybean (*Glycine max* L.) plant. Korean J. of Environ. Agri. 19(4):270-273(2001).
 11. Bradford, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem. 72:248-254(1976).
 12. Yun, B. W., H. G. Hue, S. Y. Kwon, H. S. Lee, J. K. Jo and S. S. Kwak. Antioxidant enzyme in *Nicotiana* cells containing an *Ipomoea* peroxidase gene. Phytochemistry. 48: 1287-1290(1998).
 13. Schreiber, U., Schliwa, and W. Bilger. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth. Res. 10:51-62(1986).
 14. Porra, R. J., W. A. Thompson and P. E. Kriedemann. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll by atomic absorption spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta 975:384-394(1989).
 15. Walker, D. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. D. Walker and R. Walker, Eds. Champman & Hall, London. pp.19-57(1987).
 16. Renger, G. and U. Schreiber. Practical applications of fluometric methods to algae and higher plant research. *In* Light Emission by Plants and Bacteria. Govindjee, J. Amesz, D.C. Fork, Eds. Academic press. pp.587-619(1986).

Table 1. Growth response of gourd grown from seeds irradiated with different doses of gamma radiation

Dose (Gy)	Germination rate (%)	Cotyledon length (cm)	Cotyledon width (cm)	Seedling height (cm)
0	70.0±4.4 [†]	5.36±0.06	3.09±0.04	13.8±0.1
1	68.3±5.1	5.38±0.06	3.15±0.04	14.0±0.2
2	76.0±3.1	5.44±0.11	3.08±0.06	13.7±0.2
4	68.4±4.3	5.48±0.13	3.08±0.06	13.8±0.1
8	68.4±3.5	5.59±0.08	3.20±0.06	13.7±0.2
16	67.5±3.3	5.50±0.11	3.20±0.05	13.2±0.1
20	74.0±2.9	5.30±0.08	3.05±0.06	13.5±0.1

† : mean±SE

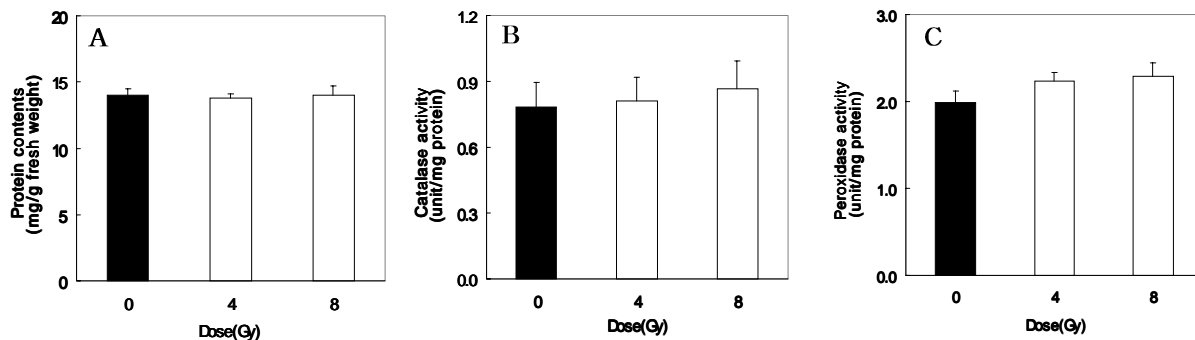


Fig. 1. Enzyme activities of gourd cotyledon grown from seeds irradiated with different doses of gamma radiation at 11 days after planting. Data represents mean \pm SE. A ; Protein contents, B ; Catalase activity, C ; Peroxidase activity.

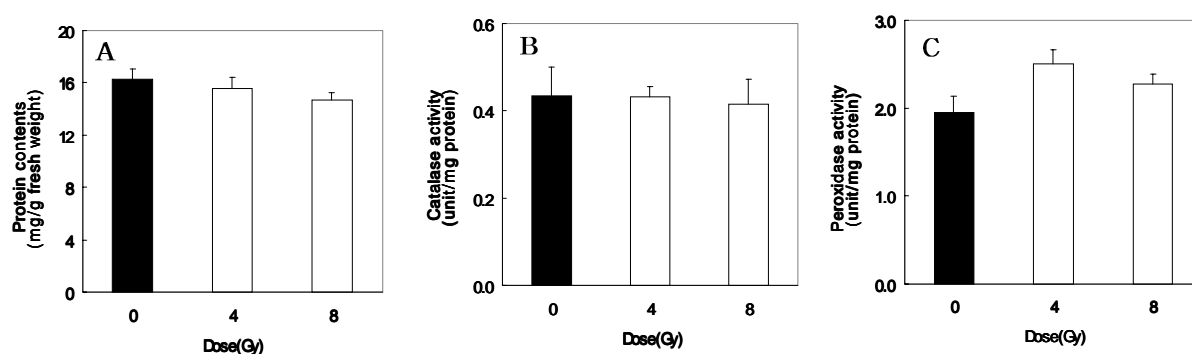


Fig. 2. Enzyme activities of gourd leaf grown from seeds irradiated with different doses of gamma radiation at 18 days after planting. Data represents mean \pm SE. A ; Protein contents, B ; Catalase activity, C ; Peroxidase activity.

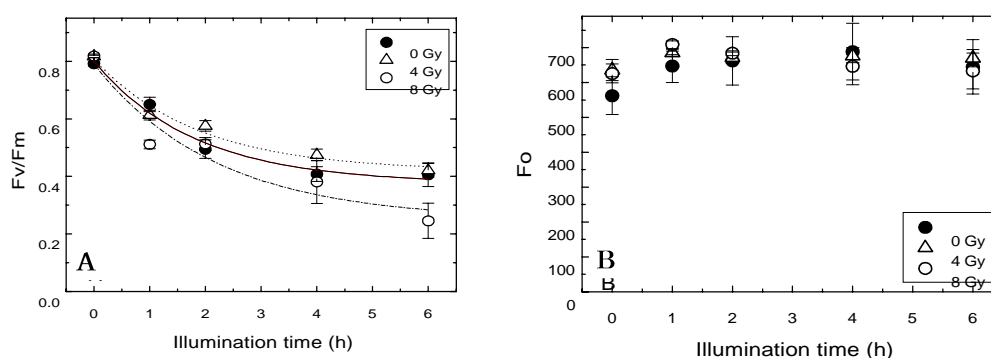


Fig. 3. A. Changes in the maximal photochemical efficiency of PSII (Fv/Fm) with illumination time. B. Changes in dark-level fluorescence yield, Fo with illumination time. Gourd leaf discs were exposed to $900 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 25°C . Closed circle ; ● - Control, Empty triangle ; △ - 4 Gy treatment, Open circle ; ○ - 8 Gy treatment.

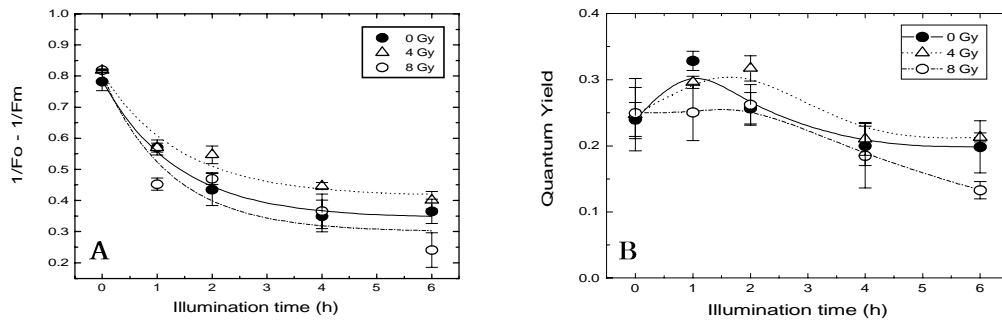


Fig. 4. A. Changes in the fluorescence parameter $1/F_o - 1/F_m$ with illumination time. B. Changes in the effective quantum yield of photochemical energy conversion at PSII reaction centers, Φ_{PSII} with illumination time. Gourd leaf discs were exposed to $900 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 25°C . Closed circle ; \bullet - Control, Empty triangle ; Δ - 4 Gy treatment, Open circle ; \circ - 8 Gy treatment.

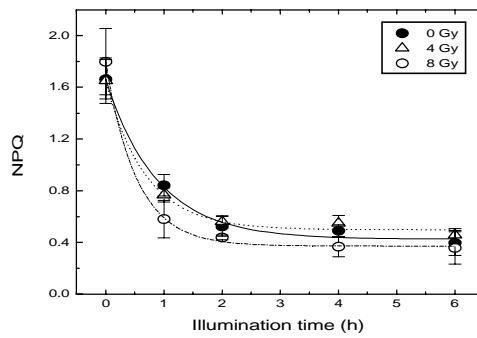


Fig. 5. Changes in the non-photochemical quenching, NPQ with illumination time. Gourd leaf discs were exposed to $900 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 25°C . Closed circle ; \bullet - Control, Empty triangle ; Δ - 4 Gy treatment, Open circle ; \circ - 8 Gy treatment.

Table 2. Changes in the total chlorophyll concentration ($\mu\text{mol/m}^{-2}$) with illumination time of gourd grown from seeds irradiated with different discs of gamma irradiation

Dose (Gy) \ Time (h)	0	4	8
0	$329 \pm 56.7^\dagger$	262 ± 25.1	263 ± 12
1	307 ± 52.3	273 ± 1.71	272 ± 11.9
2	340 ± 39.8	268 ± 21.1	269 ± 14.8
4	340 ± 110.1	322 ± 39.1	262 ± 14
6	318 ± 60.3	257 ± 12.2	234 ± 11.4

\dagger : mean \pm SE