

Dose-Response Relationship of Micronucleus Fequency in Pollen Mother Cells of *Tradescantia*

Jin Kyu Kim, Hi Sup Song, Soung-Hee Hyun*

Korea Atomic Energy Research Institute, *Eulji University

자주달개비 화분모세포 미세핵 생성률의 방사선량-반응 관계

김진규 · 송희섭 · 현성희*

한국원자력연구소, *울지외과대학교

(1999년 12월 8일 접수, 2000년 2월 18일 채택)

Abstract - This study was carried out to investigate the radiation dose-response of micronucleus frequencies in *Tradescantia* pollen mother cells. The number of micronuclei increased in the tetrads as a result of chromosome deletion after irradiation. The maximal frequency of micronuclei showed a good dose-response relationship in the range of dose 0~50 cGy. On the basis of the relationship, a dose of 1 cGy results maximally in two additional micronuclei in 100 tetrads. The radiation dose-response relationship of micronucleus occurrence is prerequisite to biological monitoring of radiations. The micronucleus assay can be applied to biological risk assessment of environmental toxicants, and to integrity test of water or soils of interest.

Key Words : dose-response, micronucleus, radiation, *Tradescantia*

요약 - 본 연구는 이온화 방사선이 자주달개비 화분모세포의 미세핵 생성에 미치는 영향을 분석하여 선량-반응 관계를 수립하고자 수행되었다. 자주달개비의 화분모세포는 감수분열을 통하여 4개의 꽃가루로 발전되는 생식세포로서 분열과정 중에 방사선에 노출되면 염색체 조각이 분리되어 미세핵을 형성한다. 감마선 선량이 증가함에 따라 미세핵 생성률도 증가하였으며 특히 50 cGy까지의 선량 범위에서 선량별 미세핵 생성률의 최대값은 뚜렷한 선량-반응관계를 보였다. 선량-반응 관계식을 통해 볼 때 1 cGy의 부가적 선량은 100 사분자당 최대 2개씩의 미세핵을 추가로 생성시키는 것으로 나타났다. 화분모세포 미세핵 생성률의 방사선 지표성은 생물학적 방사선량 감시를 위한 필수선행 사항일 뿐 아니라 공해물질의 생체 위해성 검증, 수질과 토양의 건전성 평가 등에 대한 응용성을 갖고 있다.

중심어 : 선량-반응, 미세핵, 방사선, 자주달개비

서 론

생물체의 생식기관은 방사선에 매우 민감한 세포들로 구성되어 있기 때문에 이온화방사선에 의한 손상이 쉽게 나타난다. 자주달개비의 화분모세포(PMC; pollen mother cell)는 감수분열을 통하여 4개의 꽃가루를 형성하는 웅성 생식세포로서 방사선 또는 돌연변이원에 매우 민감하다 [1-4]. 특히 감수분열중인 화분모세포의 염색체는 동일개체의 분열중인 체세포 염색체보다도 훨씬 방사선에 민

감하다는 사실이 잘 알려져 있다 [4,5]. 그러나 화분모세포의 감수분열 중기 I (metaphase I) 염색체가 매우 엉성하여 검경시 모양을 뚜렷이 관찰하기 힘들다는 단점을 지니고 있기 때문에 염색체이상 분석에 잘 이용되지 못했었다. 방사선 생물학적 연구와 관련하여 이 같은 단점을 극복하기 위해서는 방사선 처리를 감수분열 전기 I 초기에 맞추어 시행하고 난 후 분열중인 염색체에 대한 적당한 회복시간을 부여하여야 한다 [6]. 무동원체 염색체 조각 (acentric fragment)이나 점착성 염색체 복합부위 (sticky chromosome complex)가 감수

분열의 4분자염색체 (tetrad) 시기에 미세핵으로 남게 된다. 이것을 이용한 분석과정을 일명 Trad-MCN assay라 하여 돌연변이 유발물질이나 방사선에 의한 염색체 손상 연구에 이용되기 시작하였다 [7,8]. 1950년대 초반에 일부 연구자들에 의해 식물체가 영양부족 등의 화학적 결손에 의하여 PMC에서 미세핵이 생성됨을 밝혔다 [9,10]. 1970년대 초부터 포유동물 감수분열 세포에서도 미세핵의 생성은 염색체 손상을 의미하는 유용한 지표로서 이용되기 시작하면서부터 동물세포는 물론 식물세포에 있어서도 미세핵은 염색체 손상을 나타내는 명백한 지표로서 인식되기에 이르렀다 [8,11]. 최근에는 자주달개비 미세핵 분석법을 이용하여 오염 토양 및 수자원의 유전독성 평가 [12], 액체상 또는 기체상의 살충제의 유전독성 평가 [13], 비이온화 방사선에 의한 유전자손상 분석 [14] 등 자주달개비 미세핵 분석법의 응용분야가 급속도로 다양화되고 있다.

본 연구는 Muller and Streffer [15]에 의하여 제시된 방사선에 대한 생물지표로서의 조건들을 상당 부분 충족시키며, 저선량 방사선에 민감하게 반응하는 것으로 밝혀진 자주달개비를 대상생물로 이용하여 화분모세포의 미세핵 생성률과 감마선과의 선량-반응 관계를 수립하고, 타 분야 연구에 응용할 수 있는 미세핵 분석기술을 확립하고자 수행되었다.

재료 및 방법

방사선 조사 : 생육상태가 양호하며, 최소 10개 이상의 화아를 가지고 있는 어린 화서 (inflorescence)를 절취하여 1일간 실험실 조건에 순치시킨 다음 5~7개씩을 한 실험군으로 묶어 방사선을 조사하였다. 방사선원은 저준위 조사시설의 ^{60}Co (선원강도 약 150 TBq, Panoramic irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)을 이용하였고, 조사시간이 오래 걸리는 경우는 절취화서 (cuttings)가 시드는 것을 방지하기 위해 양액에 침지한 상태로 조사하였다. 방사선 조사가 끝난 절취화서는 새로운 Hougland's solution No.2 6배 희석액 [16]에 침지하여 생육상 (growth chamber) 내에서 폭기 (aeration)를 실시하였다. 기타의 배양조건은 기내 배양시와 동일하였다.

미세핵 분석 : 화분모세포에 생성된 미세핵을 분석하기 위해서는 화서의 고정 및 염색과정을 거

쳐야 한다. 일련의 처리과정은 Ma [17]의 절차를 따랐다. 방사선 조사가 끝난 시료는 양액에 침지하여 생육상 내에서 약 24~30 시간의 분열 염색체 회복시간이 경과한 다음 분석용 화서를 aceto-alcohol (1:3)로 고정시켰다. 고정액에 침지하여 24시간이 지나면 70% 에탄올에 담구어 냉장 저장하였다. 미세핵 검경을 위한 프레파라트의 제작은 'aceto-carmine squash method'에 따라 이뤄졌다. 전처리가 끝난 후 실험군별로 15~18개의 슬라이드 프레파라트를 제작하고, 광학현미경 (Nikon) 하에서 배율 400배로 검경하여 미세핵을 계수하였다. 통상 하나의 프레파라트에서 약 300개 이상의 4분자염색체를 검경하여 100 사분자당 미세핵 숫자로서 각 실험조건별 미세핵 생성률로 환산하였다.

결과 및 고찰

화분모세포 생성변화

PMC는 고등 현화식물에 있어서 꽃가루로 분할될 2n 상태의 세포로서 2회에 걸친 연속 감수분열 과정을 거쳐 한개의 PMC로부터 4개의 반수체 화분 (microspore)을 형성한다. 자주달개비의 PMC 감수분열 과정은 비교적 잘 연구되어 있다 [18]. 분열중인 체세포에 비해 화분모세포는 분열과정중 방사선에 의한 염색체 손상에 매우 취약하기 때문에 이때 절단된 무동원체 염색체 단편이나 점착성염색체복합물의 분열이 종료된 후 미세핵으로 남게 되므로 이를 이용하여 방사선량을 평가 또는 산정할 수 있다. 분열중 각 시기 (stage)의 기간은 자주달개비 종류와 생육상태에 따라 다소간의 차이를 보일 것이다. 이러한 분열 시기별 시간구조를 파악하고 방사선 처리 후 공시재료에 부여할 염색체 회복시간의 결정이 선행되어야 MCN 분석을 통한 방사선량 평가가 가능하다. 화서내에 나선상으로 배열되어 있는 화아중 사분자가 가장 많이 나타나는 것을 결정하기 위해서 가장 큰 화아 (24~48시간 이내에 개화)에서부터 미세조작이 가능한 가장 작은 화아까지 사분자 비율을 분석하였다 (그림 1).

절취화서를 실험조건으로 설정된 배양기 내에서 하루 동안 안정화시킨 후 화서를 고정하여 프레파라트를 만든 후 검경한 결과 나선상으로 배열된 화아의 큰 것부터 시작하여 7, 8번째 화아의 사분자 구성비가 매우 높았다. 따라서 방사선 조사시료 및 대조시료의 프레파라트 제작에는 7, 8번째

화아만을 사용하였다. 그러나 7, 8번째 화아가 사분자를 가지고 있을 확률이 20~50 %에 지나지 않기 때문에 프레파라트 제작에 앞서 실체현미경 하에서 사진 확인과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있었다. 적정 화아로 판별된 7번 및 8번 화아라도 사분자를 갖고 있을 확률이 낮은 것은 화서에 따라 화아의 개수가 편차를 나타내며 이에 따라 화아의 발달정도가 크게 다르기 때문인 것으로 생각된다. 한편 미세조작과 관련하여 7, 8번째 화아의 크기가 매우 작고, 때로 포엽 (bract)속에 깊이 묻혀 있기 때문에 미세조작에 숙련될 때까지는 프레파라트 제작에 실패할 수도 있는 난점이 상존하고 있다.

방사선을 조사한 화서를 고정하기 전에 생성된 미세핵이 안정적 형태를 갖추게 하기 위해 부여해야 할 회복시간 (recovery time)의 적정성을 확인코자 방사선 조사 후 6시간 간격으로 화서를 고정하였다. 각 고정시간대별 미세핵검경 결과를 표 1에 나타내었다. 염색체 손상회복에 필요한 적정시간은 전술한 화아분석의 경우에 절취화서의 순치를 위해 부여했던 시간과 일치하는 것으로 밝혀졌다. 이 결과에 따라서 모든 실험 화서는 방사선을 처리하여 24시간이 경과한 다음 시료를 고정하였다. 정확한 화서 고정시간을 결정하기 위해서는 조밀한 간격별로 분석이 이뤄져야 하지만 방사선 조사 후 24시간을 fixation point로 결정한 것은 기존의 연구결과에 비추어 볼 때 그 합리성이 인정될 수 있다. Ma et al. [19]은 *T. palludosa*를 이용하여 화분모세포의 X-선에 대한 분열시기별 민감도를 분석하였다. 미세핵 생성물은 방사선 조사 후 약 20시간이 경과한 최대 값을 나타내기 시작하여 48시간까지 지속되는 포화양상을 상당기간 유지하는 것으로 분석되었다.

선량반응 관계

자주달개비 화서내에는 다양한 발육상태의 화아들이 공존하고 있으며, 특히 이들중 일부 화아 내에는 감수분열중인 화분모세포가 들어 있음은 이미 기술한 사항이다. 감수분열중인 화분모세포는 방사선에 매우 민감하기 때문에 방사선을 받게 되면 염색체의 일부가 절단되어 미세핵을 형성하게 된다. 미세핵의 생성률은 방사선량의 증가에 따라 점차 증가하는 양상을 나타냈으나, 50 cGy 이상의 다소 높은 선량영역에서는 MCN 생성률의 변이가 매우 크게 나타나서 선량-반응 관계를 규정짓기는 곤란한 것으로 밝혀졌다 (그림 2). 그러나 0~50 cGy 선량범위에서 평균값보다는 최대 MCN 생성률이

갖는 선량-반응 관계가 뚜렷하다는 것을 알 수 있었다 (그림 3). 최대 미세핵 생성률이 갖는 감마선량 반응식은 (1)식과 같다.

$$F_{MCN} = 1.97D + 4.05, (r^2 = 0.95) \tag{1}$$

여기서,

F_{MCN} ; 최대 미세핵생성률 (MCN/100 tetrads)
D는 ; 감마선량 (cGy).

이 관계식의 회기계수 $r^2 = 0.95$ 로 0~50 cGy 선량범위에 있어서의 선량-반응 관계를 일차함수로 표현하는 것에 무리가 없음을 알 수 있었다. 관계식의 정의에 따르면 미세핵의 자연생성률 (background rate)은 최대 4 MCN/100 tetrads인데 이 값은 실제로 분석된 화분모세포 미세핵 자연생성률의 범위와 일치하는 것으로 나타났다 [20].

고찰

자주달개비 미세핵 분석법은 비교적 단순하며, 신속한 분석방법으로 결과를 1~2일 내로 얻을 수 있다. 방사선 처리시기를 감수분열 전기 I에 맞추어 분석할 경우 5 cGy 까지의 X-선을 감지해 낼 수 있으며 [3], 이같은 장점을 이용하여 대기오염 물질이나 화학적 돌연변이원의 현장 감시에도 적용 가능하다 [17,19]. 본 연구의 선량-반응 관계를 통하여 확인된 바와 같이 환경내에 존재하는 각종 요인들의 복합적 작용으로 인하여 자연상태에서도 4 MCN/100 tetrads의 미세핵 생성률이 나타났으며 분석값의 변이폭을 고려한다면 사분자당 10 여개의 미세핵은 자연적으로 발생할 수 있다는 점을 간과해서는 안된다. 대조 값으로서의 자연생성률을 사전에 확인하는 것은 미세핵 분석법을 통한 생물학적 환경감시에 있어 필수적인 과정이며 부가적인 방사선량이나 돌연변이원 또는 환경독성물질의 영향으로 증가되는 미세핵 생성률을 정확하게 산정하기 위한 선결과정이다.

실험연구에 이용되는 자주달개비는 주로 무성생식의 일종인 분주법으로 증식되기 때문에 유전적 특성이 균일하게 유지될 수 있다. 화분모세포는 고등식물의 생식세포이기 때문에 PMC의 염색체 손상의 정도는 곧 다음 대 (generation)로 이어지는 유전적 손상의 척도이기도 하다. 특히, 절취화서는 *in vivo*인 동시에 *in vitro*로 간주될 수 있기 때문에 획득한 결과에 대한 생물학적 의미가 인정될 수 있다. 방사선처리 후 고정된 화서시료는 훗

날의 세포유전학적 실험분석을 위해 대량으로 장기보존할 수 있다는 점과 검경을 위해 제작된 프래파라트도 적당한 부가적 처리과정을 거쳐 영구표본으로 보관할 수 있다는 점은 큰 장점들로 인식된다. 사분자세포의 평균 크기가 약 20 μm 이며, 생성된 미세핵의 경우도 0.5~3 μm 로 비교적 크기 때문에 현미경하에서 용이하게 관찰할 수 있다.

반면에 MCN 분석법이 안고 있는 단점들도 있다. 미세핵을 이루는 염색체의 손상만을 말단점(end-point)으로 평가하기 때문에 분석결과는 단순한 상대적 손상정도를 지표할 뿐 정확한 염색체 손상을 모두 지표하지는 못한다. 다시 말하자면 역위(inversion), 전좌(translocation), 중복(duplication) 등의 염색체 이상과 염색분체 교환, 염색분체 재배열 등의 염색분체 이상에 대한 정보는 MCN 분석을 통해서 얻을 수 없다. 또한 TSH 분석법과는 달리 식물체의 부분 중에서도 극히, 제한적인 감수분열기만을 분석대상으로 삼기 때문에 누적된 방사선량에 대한 정보를 전혀 얻을 수 없다. 특히 화분모세포의 미세핵 생성은 방사선이나 돌연변이원에 지나치게 민감하여 미세핵 자연발생률이 식물의 생육 조건에 따라 변이를 보이게 될 뿐 아니라 방사선량이 높은 영역에서는 오히려 화분모세포의 감수분열 자체가 억제되거나 세포의 대사가 저해되기 때문에 미세핵 생성물의 선량반응 관계가 다소 모호해지는 단점이 있다.

결 론

자주달개비의 방사선 지표성을 평가하기 위해 미세핵 분석법을 이용하여 감수분열중인 화분모세포에서 생성되는 MCN의 발생빈도를 측정하였다. 방사선량의 증가에 따라 미세핵 생성량도 증가하였으며 특히 50 cGy까지의 범위에서 측정된 선량별 최대 생성물은 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타냄을 알 수 있었다. 수립된 선량-반응 관계를 통하여 볼 때 1 cGy의 부가적 방사선량은 100개의 사분자 염색체당 최대 2개씩의 미세핵을 유발시키는 것으로 밝혀졌다. 이같은 미세핵 분석법은 TSH 체세포돌연변이 분석법과 병용할 경우 매우 효과적이며 합리적인 선량감시의 수단이 될 수 있을 것이다. 방사선의 생물학적 감시는 물론 방사선 방어물질 개발 등의 응용 분야에도 폭넓게 활용될 수 있을 뿐 아니라 기체상, 액체상 환경오염 물질의 준위 판별, 독성물질 또는 돌연변이 유발물질의 생체 위해성 검증, 수질 및 토질 건전성 평가

를 위한 진단시스템 개발 등에도 확장적용이 가능하다.

사 사

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

References

1. T. H. Ma, "The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China", *Mut. Res.* 426, 103-106(1999)
2. Z. Xu, and T. H. Ma, "Clastogenicity of formaldehyde fumes and X-rays evaluated by the *Tradescantia*-micronucleus assay", *Environ. Exp. Bot.* 39, 169-175(1998)
3. T. H. Ma, "Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia* - A promising mutagen test system", *Mut. Res.* 64, 307-313 (1979)
4. T. H. Ma, G. J. Kentos, Jr. and V. A. Anderson, "Stage sensitivity and dose response of meiotic chromosomes of pollen mother cells of *Tradescantia* to X-rays", *Environ. Exp. Bot.* 20, 169-174(1980)
5. K. Sax, "Chromosome aberrations induced by X-rays", *Genetics* 23, 494-516(1938)
6. J. H. Taylor, "The duration of differentiation in excise anthers". *Am. J. Bot.* 37, 137-140 (1950)
7. W. F. Grant, "Higher plant bioassays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations--a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals", *Mut. Res.* 426, 107-112(1999)
8. J. R. K. Savage, and D. G. Papworth, "An investigation of LET 'finger-prints' in *Tradescantia*", *Mut. Res.* 422, 313-322(1998)
9. D. Steffensen, "Induction of chromosome breakage at meiosis by a magnesium deficiency in *Tradescantia*", *Proc. Nat. Acad. Sci.* 39, 613-620(1953)
10. D. Steffensen, "Breakage of chromosomes in *Tradescantia* with a calcium deficiency", *Proc. Nat. Acad. Sci.* 41, 155-160(1955)

11. J. A. Heddle, "A rapid *in vivo* test for chromosome damage", *Mut. Res.* 18, 187-190(1973)
12. M. S. Kong, and T. H. Ma, "Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassay", *Mut. Res.* 426, 221-228(1999)
13. K. B. Mohammed, and T. H. Ma, "*Tradescantia*-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of gaseous and liquid forms of pesticides", *Mut. Res.* 426, 193-199(1999)
14. S. Wang, and X. Wang, "The *Tradescantia*-micronucleus test on the genotoxicity of UV-B radiation", *Mut. Res.* 426, 151-153(1999)
15. W. U. Muller, and C. Streffer, "Biological indicators for radiation damage", *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 863-873(1991)
16. A. Conger, "A simple liquid-culture method of growing plants", *Proc. Florida State Horticultural Society.* 77, 3-6(1964)
17. T. H. Ma, "*Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening", *Environ. Health Prospect.* 37, 85-90(1981)
18. J. H. Taylor, "The duration of differentiation in excise anthers", *Am. J. Bot.* 37, 137-140 (1950)
19. T. H. Ma, V. A. Anderson, and I. Ahmed, "*In situ* monitoring of air pollutants and screening of chemical mutagens using *Tradescantia* micronucleus bioassay", *Proc. 11th Ann. Meet. Environ. Mutagen Soc.*(1980)
20. J. K. Kim, *et al.*, *Biological Monitoring of Radiation using Indicator Plants*, KAERI/RR-1583/95, Korea Atomic Energy Research Institute(1995)

Table 1. Time evolution of micronucleus occurrence in T. BNL 4430 after exposure to 1 Gy of gamma ray.

Fixing time (hrs) after irradiation	Micronuclei/100 tetrads		Remarks
	bud # 7	bud # 8	
6	0	2	Fixing point
12	11	19	
18	49	68	
24	72	129	
30	64	97	

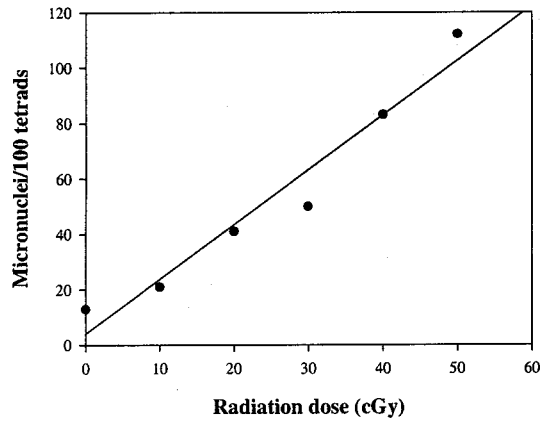


Fig. 3. Linear regression on dose-response curve of the highest micronucleus occurrences at given radiation doses.

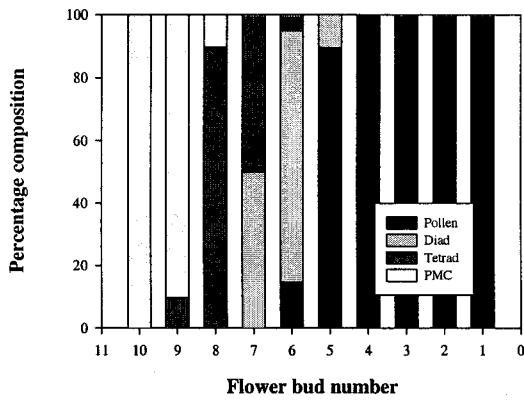


Fig. 1. Composition of tetrads, diads and pollens in each flower bud.

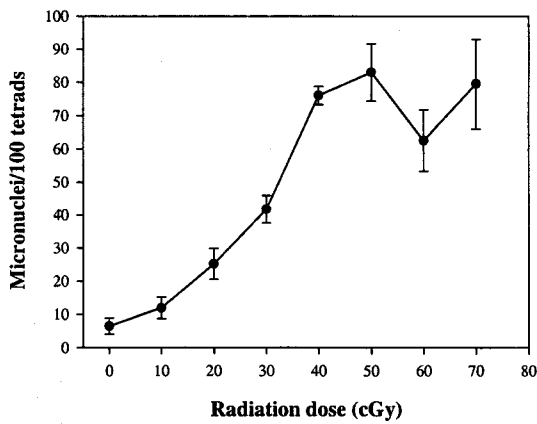


Fig. 2. Dose-response relationship of MCN in pollen mother cells of T. BNL 4430.