

자주달개비 수술털에서 방사선에 의해 유발되는 분홍돌연변이에 대한 광주기의 영향

김원록 · 김진규 · A. Cebulska-Wasilewska¹

(한국원자력연구소, ¹폴란드원자물리연구소)

적 요 - 광주기가 방사선에 의해 유발된 자주달개비 체세포돌연변이에 미치는 영향을 실험적으로 평가하였다. 포트에서 생육된 *Tradescantia* 4430 식물체에 코발트 선원으로부터 0.3, 0.5 및 1.0 Gy의 감마선을 조사하였으며 수술털 세포에 나타나는 분홍돌연변이를 분석하였다. 감마선 0.5 Gy를 기준선량으로 평가하였을 때 대조 실험군(CT)은 방사선 조사 후 6일 경과시부터 돌연변이율이 증가하기 시작하여 조사 후 10일째에 최고값에 도달하였다. 명기가 20시간인 실험군(PP20)에서는 방사선 조사 후 6일 경과시부터 돌연변이율이 증가하기 시작하여 조사 후 9일째에 최고값에 이르렀다. 반면에 명기가 4시간으로 제한된 실험군(PP4)에 있어서는 조사 후 10일째부터 돌연변이율이 급격히 증가하기 시작하여 16일 경과시 최고값에 도달하였다. CT 실험군에 있어서 감마선 조사에 의하여 유발되는 분홍돌연변이 빈도의 증가계수 5.99($r^2=0.99$)에 비해 PP20과 PP4 실험군에 있어서는 각각의 돌연변이 빈도 증가계수는 6.93($r^2=0.98$)과 11.74($r^2=0.99$)로 PP20 실험군에 있어서는 15.7%, PP4 실험군은 95.9%의 증가 효과를 나타내었다. 결론적으로 비정상적인 광주기는 자주달개비 수술털에 대한 이온화 방사선의 분홍돌연변이 유발효과를 증가시키는 동시에 방사선에 의한 세포 유전자 손상의 회복을 상당기간 지연시키는 원인이 된다.

서 론

생물체는 주변의 생물이나 무생물적 환경요인들과 상호작용을 하며 살아가는데 환경요인의 일정한 범위내에서만 생존과 서식이 가능하다. 이같이 정상적 생존이 가능한 환경조건의 내성한계(tolerance limit)를 벗어나는 경우 생물체는 손상을 받게 된다. 환경 내에는 생물체에 대한 여러 가지 스트레스 요인이 존재하며 일부 생물은 이러한 요인의 변화에 민감하게 반응한다. 특히 식물의 생육에 있어서 온도, 광, 수분, 토양 등이 중요한 환경요인으로 작용하며 특히 광주기는 많은 식물들에 있어서 생장, 개화 및 생식 등과 직접적으로 관련이 있는 중요한 인자이다(Salisbury & Ross 1992).

자주달개비는 꽃색의 표현형이 자주색(또는 남색)으로 화서의 발생 또는 수술털 세포의 분열과정 중에 방사선을 포함한 돌연변이원이나 발암원에 노출될 경우 남색과 관련이 있는 델피니딘 좌위(delphinidin loci)가 손상을 받아 세포의 색이 분홍 또는 무색으로 바뀌는 체세포 돌연변이가 쉽사리 일어난다(Christianson 1975).

이와 같은 특징으로 인하여 자주달개비 수술털(TSH; *Tradescantia* stamen hairs)은 다양한 이온화방사선에 의해 유발되는 체세포 돌연변이의 생물학적 효과를 연구하는데 있어서 모델 시스템으로 널리 사용되고 있을 뿐만 아니라 화학적 돌연변이원 연구(Gichner *et al.* 1980; Cebulska-Wasilewska 1988b; Ichikawa 1992), 방사선 물질 오염 토양의 건전성 평가(Ichikawa & Ishii 1991), 수생환경에서의 돌연변이원 감지(Grant *et al.* 1992) 및 대기중의 돌연변이 유발력 감지와 환경모니터링에도 널리 이용되고 있다(Cebulska-Wasilewska 1988a, 1992; Ma *et al.* 1994).

최근에는 자주달개비 수술털 돌연변이계를 이용하여 방사선에 대한 선량-반응 규명(김과 김 1998)과 살충제에 의한 방어효과 연구(김 등 1999), 방사선의 생물학적 효과 분석(Cebulska-Wasilewska *et al.* 1999) 등 폭넓은 연구가 이뤄졌다. 또한 기온일교차(김 등 1998)와 염분(김 등 1999) 등의 환경스트레스가 방사선과 함께 복합적으로 작용하였을 때 나타나는 상호작용이나 길항작용을 평가하기 위한 생물학적 실험계로도 자주달개비가 이용되고 있다.

식물체와 환경요인의 관련성을 규명하기 위한 연구의 일환으로 자주달개비를 이용한 환경생물학적 연구가 폭 넓게 진행되어 왔음에도 불구하고 광주기가 방사선과 함께 자주달개비 T-4430 클론에 있어서 수술털 세포의 체세포 돌연변이에 미치는 복합적 영향을 연구한 사례는 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구에서는 환경스트레스의 생물학적 의미와 중요성을 알아보기 위하여 방사선에 의하여 유발된 자주달개비 수술털 분홍돌연변이 빈도가 광주기의 영향에 따라 어떻게 변화하는지를 실험적으로 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험용 식물체는 폴란드원자물리연구소(The Henryk Niewodniczanski Institute of Nuclear Physics, Kraków, Poland)로부터 입수하여 증식한 *Tradescantia* 4430(T-4430) 클론을 사용하였다. 포트에서 건전하게 육성된 식물체를 실험실로 옮겨 24시간 동안 성장상 조건에 순치시킨 후 사용하였으며 조사군 별로 20개 이상의 포트를 사용하여 실험기간중 200 화기 이상의 분석이 가능하도록 하였다.

2. 방사선 조사

한국원자력연구소의 감마선원(^{60}Co , 선원강도 약 1.5×10^{14} Bq, Panoramic irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)를 이용하여 상온, 공기 중에서 시료를 0.3, 0.5 및 1.0 Gy의 선량으로 조사하였다. Fricke dosimeter로 측정된 조사 선량률은 0.42 Gy/h 였다(Niels & Roger 1970).

3. 식물체 배양·유지

방사선을 조사한 식물체는 포트 채로 성장상 내에서 배양하였으며 Hougland No. 2 용액을 6배 희석하여 (Conger 1964) 3일 간격으로 공급하였다. 방사선만 조사한 대조군(CT)은 온도 20°C, 명기 14시간, 암기 10시간, 상대습도 85%, 조도는 290 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ 로 조광은 대형메탈램프로 하였으며 형광등을 보조광원으로 사용하였다. 광주기는 PP20 실험군에 있어서는 명기 20시간, 암기 4시간, 그리고 PP4 실험군은 명기 4시간, 암기 20시간을 유지하였으며 나머지 실험조건은 CT 실험군과 동일하게 유지하였다.

4. 검경분석

현미경(Nikon SMZ-U, $\times 25$)하에서 돌연변이를 계수

하였으며, 만개상태의 화기를 실험군별로 채취한 다음 6개의 수술을 모두 떼어내 파라핀유가 도말된 슬라이드 상에 펴서 검경용 프레파라트를 제작하였다. 분홍돌연변이는 한 개 또는 다수의 연속된 분홍세포군 각각을 하나의 돌연변이 건(event)수로 계수 하였다. 돌연변이 세포의 계수는 방사선 조사 후 4주 이상 지속적으로 실시되었으며, 분홍돌연변이율(pink mutation rate)은 100 모당 돌연변이건수(pink events/100 hairs)로 산정하였고, 방사선을 조사하지 않은 대조시료의 분홍돌연변이율을 보정자료로 사용하였다.

결과 및 고찰

방사선에 의하여 유발되는 자주달개비 수술털 세포의 돌연변이율은 일반적으로 방사선 조사 후 4~6일경부터 증가하기 시작하여 최대값에 이른 다음 다시 감소하여 자발돌연변이율수준까지 낮아지는 경향을 보이는데 일반적으로 돌연변이율 고조기간은 방사선 조사 후 6일에서 20일 사이에 나타나지만 공시식물체의 생육상태 및 실험처리시의 손상 정도 등에 따라 다르게 나타날 수도 있다(김 등 1999).

CT 실험군에 있어서 중간조사선량인 0.5 Gy 조사군을 기준으로 했을 때 방사선에 의한 분홍돌연변이율은 조사 후 6일부터 점차 증가하기 시작하여 조사 10일후 4.76 ± 0.34 으로 최대값을 보였으며(Fig. 1A), PP20 실험군에서도 조사 후 6일부터 분홍돌연변이율이 증가하기 시작하여 조사 9일 후에 3.87 ± 0.36 으로 최대값을 나타내어(Fig. 1B) CT 및 PP20 두 실험군에 있어서 분홍돌연변이가 증가하는 시기와 최대값을 나타낸 시점이 커다란 차이를 보이지 않았다. 그러나 PP4 실험군은 조사 후 10일부터 급격히 증가하기 시작하여 조사 16일 후에 6.25 ± 0.84 로 최대값을 나타내었다(Fig. 1C). 따라서 광주기를 비정상적으로 아주 짧게 한 경우에 있어서는 광주기를 길게 한 경우보다 방사선에 의해 유발된 자주달개비 수술털의 분홍돌연변이율이 증가하는 시기가 다른 두 실험군에 비하여 4일 정도 지연되었을 뿐만 아니라 최대값에서도 증가를 나타내었다. 이는 김 등(1998)의 기온일교차에 따른 분홍돌연변이의 실험결과에서 20°C의 큰 폭의 기온일교차를 준 실험군에 있어서는 분홍돌연변이율이 증가하여 최대값을 나타내는 시기가 기온일교차가 없는 실험군에 비하여 4일 정도 지연되었다고 보고하였는데 본 실험에서도 짧은 광주기에 의해 유사한 실험결과를 나타내었다.

일반적으로 분석결과의 통계적 오차와 분산을 최소화하기 위하여 돌연변이율이 최대값에 이르는 날짜를 중

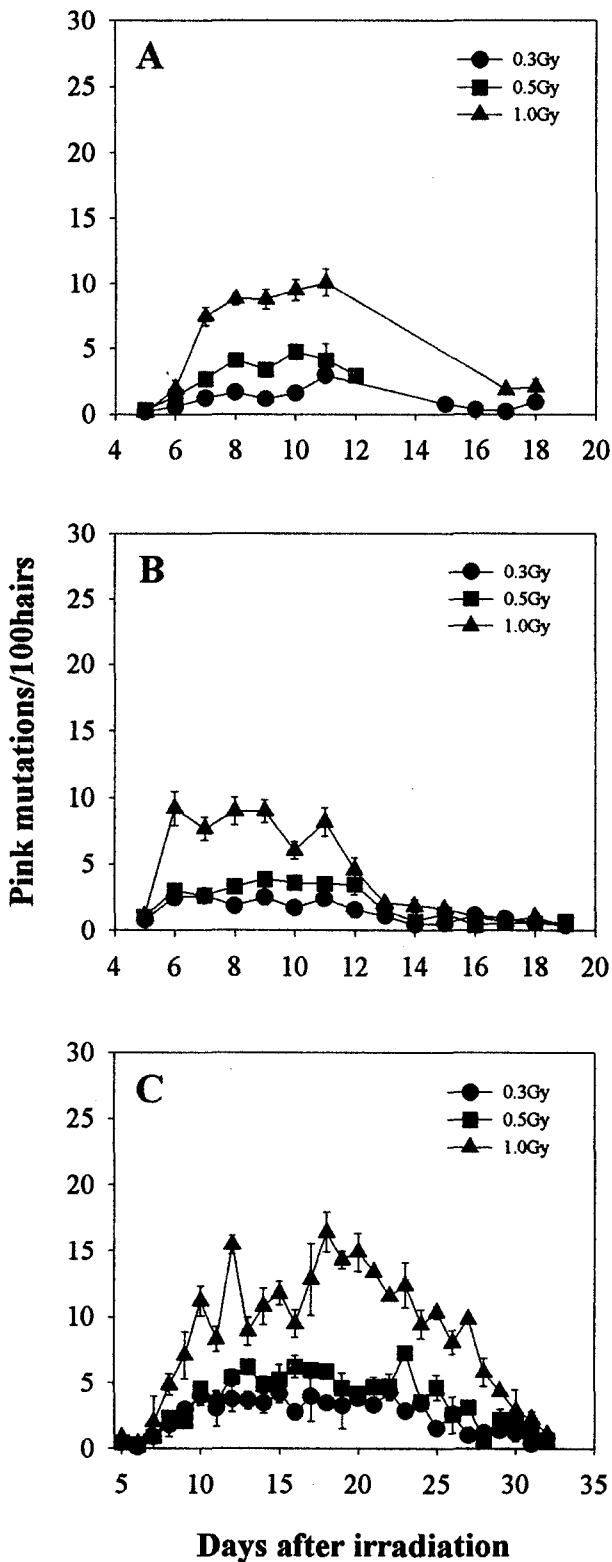


Fig. 1. Changes in pink mutation frequencies in the stamen hairs of *Tradescantia* 4430 after irradiation (A; CT, B; PP20, C; PP4). Bars represent the standard error (n=12).

심으로 일정한 기간을 고조기간으로 설정하여 이때의 돌연변이율 검경결과를 통합하여 데이터로 활용한다. 실험군들에 있어서 분홍돌연변이가 확연하게 증가한 고조기간(peak interval)은 CT 실험군이 조사 후 6일째부터 11일까지, PP20 실험군이 조사 6일 후부터 12일까지로 두 조사군에 있어서 고조기간에는 커다란 차이를 보이지 않았으나 PP4 실험군에 있어서는 다른 두 실험군과는 달리 조사 12일 후부터 18일까지로 큰 차이를 나타내었다(Fig. 1). 설정된 고조기간중의 검경 결과를 통합하여 선량별로 수술털 100모당 평균 돌연변이율을 산정한 것을 근거로 선량반응 관계를 확인한 결과 분홍돌연변이 빈도는 뚜렷한 일차함수적 선량-반응 관계를 나타내고 있다(Fig. 2). 이같은 선형적 관계식의 회귀계수는 CT 실험군과 PP4 실험군이 0.99, PP20 실험군이 0.98로서 높은 통계적 유의성이 인정된다. 한편 CT 실험군에 있어서 감마선 조사에 의하여 유발되는 돌연변이 빈도의 증가계수 $\alpha=5.99$ 에 비해 PP20과 PP4 실험군에 있어서 각각의 돌연변이 빈도 증가계수는 $\alpha=6.93$ 과 $\alpha=11.74$ 로 높아짐을 알 수 있었다. 즉 CT 실험군에 비하여 PP20 실험군은 16% 정도 돌연변이 유발 효과의 증가를 나타낸 반면 PP4 실험군은 CT 실험군에 비하여 95% 이상의 돌연변이 유발 효과의 증가를 나타내었다. 김 등(1998)의 실험결과에서 보면 DTD20 실험군에 있어서의 돌연변이 빈도 증가계수 $\alpha=8.01$ 로 광주기를 길게한 PP20 실험군에 비해서는 다소 높은 돌연변이 유발 효과의 증가를 나타낸 반면 PP4 실험군 보다는 상당히 낮은 증가계수를 나타내었다. 비정상적으로 짧은 광주기가 큰 폭의 기온일교차 보다는 방사선에 의해 유발되는 자주달개비 수술털 세포의 분홍돌연변이율을 증가시키는데 있어서 더 심각한 환경요인으로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다. 자주달개비 수술털 세포가 방사선에 반응하여 돌연변이를 일으키는 선량-반응 관계를 가장 잘 설명 해주는 이론적 배경은 Chadwick & Leenhouts(1980)에 의하여 제시된 방사선 작용에 관한 분자이론이다. 이 이론을 이용할 경우 방사선의 생물학적 효과를 매우 효과적으로 해석할 수 있다. 또한 방사선에 의한 생물학적 효과(돌연변이, 염색체 이상 또는 종양유발 등)는 Tubiana *et al.*(1990)의 선량-반응 관계식으로 표현할 수 있다. 이러한 두 가지 이론적 모델은 모두 저선량에서부터 생물학적 반응이 선량포화를 나타내는 고선량영역까지를 해석할 수 있도록 설정된 것이나 방사선량에 의해 선정된 생물학적 말단점에 나타나는 영향이 포화점을 나타내지 않는 범위의 선량영역에 대해서는 선량-반응 관계가 단순한 선형적 일차함수로 표현될 수 있다. 본 연구 결과를 해석하기 위해 사용한 일차함수적

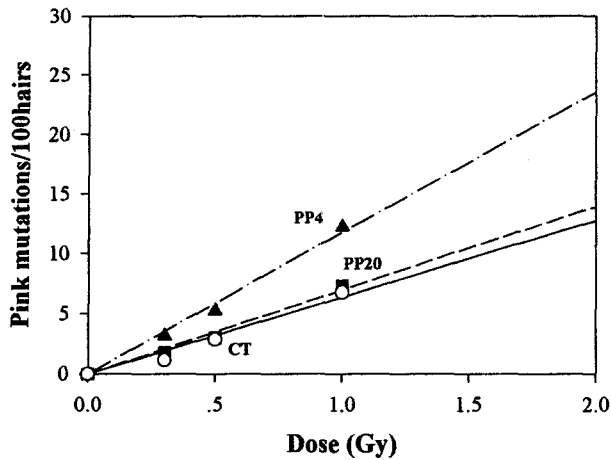


Fig. 2. Dose-response relationships of pink mutation frequencies in the stamen hairs of *Tradescantia* 4430.

관계식은 최소한의 변수만을 포함하고 있으므로 분석결과를 적용할 때 분석데이터에 대한 충분한 자유도가 유지될 수 있어서 통계적으로 안정적일 뿐 아니라 실제 해석결과를 볼 때 회귀계수가 0.98 이상으로 나타남으로써 통계적 유의성이 충분히 인정될 수 있다. 실제로 저선량 영역에 있어서 방사선에 의한 자주달개비 수술털 세포 분홍돌연변이 유발은 선형적 일차함수를 이용한 선량-반응 관계식으로 해석하는 것이 정당함은 이미 보고된 바 있다(김과 김 1998).

본 실험의 결과를 보면 식물체에 있어서 중요한 환경요인중의 하나인 광주기의 영향에 의하여 방사선에 의한 분홍돌연변이 유발효과가 뚜렷하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 선량이 증가함에 따라 PP4 실험군이 CT 실험군 및 PP20 실험군에 비하여 더욱 뚜렷한 분홍돌연변이율의 증가를 나타냈는데, 이는 광주기가 짧을수록 감마선의 선량 증가에 따른 분홍돌연변이의 증가가 유발됨을 알 수 있었다. 고조기간에 있어서도 CT 실험군과 PP20 실험군은 커다란 차이가 없었지만 특히 PP4 실험군에 있어서는 상당기간 지연되고 있음을 확인할 수 있었다. 결론적으로 비정상적으로 짧은 광주기는 환경스트레스의 하나로서 자주달개비 수술털에 대한 이온화 방사선의 분홍돌연변이 유발효과를 증가시키는 동시에 방사선에 의한 유전자 손상의 회복을 상당기간 지연시키는 원인이 된다. 특히 자주달개비 수술털 세포의 분홍돌연변이 분석을 통하여 여러 가지 불리한 환경인자들과 이온화방사선에 의하여 나타날 수 있는 방사선-환경스트레스 복합영향을 효과적으로 평가할 수 있었다.

사 사

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 특정연구개발사업(국제공동연구사업)의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 김진규, 김원록(1998) 자주달개비 수술털 분홍돌연변이의 중성자 선량 반응과 RBE. 대한방사선방어학회지 **23** : 17-23.
- 김진규, 김원록, 김재성, 신해식, 이정주(1998) 기온일교차와 감마선의 영향에 의한 자주달개비 수술털의 체세포 돌연변이 빈도. 환경생물학회지 **16** : 253-262.
- 김진규, 김원록, 이창주, 장화형, 이영근(1999) 자주달개비 수술털에서 방사선에 의해 유발되는 세포손상에 대한 살충제의 방어효과. 환경생물학회지 **17** : 21-26.
- 김진규, 김원록, 김재성, 김기남, 홍광표(1999) NaCl처리와 감마선조사에 자주달개비 수술털 세포의 분홍돌연변이 유기에 미치는 영향. 한국환경농학회지 **18** : 41-47.
- Cebulska-Wasilewska A (1988a) Detection of ambient air pollutants mutagenicity with *Tradescantia* stamen hair system. *Nukleonika*. **33** : 91-105.
- Cebulska-Wasilewska A (1988b) Interaction between radiation and chemical mutagens in the induction of somatic mutations. *Nukleonika*. **33** : 137-148.
- Cebulska-Wasilewska A (1992) *Tradescantia* stamen-hair mutation bioassay on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl nuclear accident and one year later. *Mutat. Res.* **270** : 23-29.
- Cebulska-Wasilewska A, K Rekas & JK Kim (1999) Application of TSH bioindicator for studying the biological efficiency of radiation. *Nukleonika*. **44** : 15-30.
- Chadwick KH & HP Leenhouts (1980) The Molecular Theory of Radiation Action. pp. 91-117. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Christianson ML (1975) Mitotic crossing-over as an important mechanism of floral sectoring in *Tradescantia*. *Mutat. Res.* **28** : 389-395.
- Conger A (1964) A simple liquid-culture method of growing plants. *Proc. Florida State Horticultural Society*. **77** : 3-6.
- Gichner T, J Veleminsky & AG Underbrink (1980) Induction of somatic mutations by the promutagen dimethylnitrosoamine in hairs of *Tradescantia* stamen. *Mutat. Res.* **78** : 381-384.
- Grant WF, HG Lee, DM Logan & MF Salamone (1992) The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment.

- Mutat. Res.* **270** : 53-64.
- Ichikawa S (1992) *Tradescantia* stamen hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its responses to ionizing radiation and chemical mutagens, and some synergistic effects found. *Mutat. Res.* **270** : 3-22.
- Ichikawa S & C Ishii (1991) Somatic mutation frequencies in the stamen hairs of *Tradescantia* grown in soil samples from the Bikini Island. *Jpn. J. Genet.* **66** : 27-40.
- Ma TH, GL Cabrera, A Cebulka-Wasilewska, R Chen, F Loarca, AL Vandenberg & MF Salamone (1994) *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutat. Res.* **310** : 211-220.
- Niels WH & JB Roger (1970) Manual on Radiation Dosimetry. Marcle Dekker Inc., New York.
- Salisbury F & CW Ross (1992) Plant physiology. 4th Ed. Wadsworth Inc., Belmont.
- Tubiana M, J Dutreix & A Wambersie (1990). Introduction to Radiobiology. Taylor & Francis, London.

Effect of Photoperiod on Radiation-Induced Pink Mutations in *Tradescantia* Stamen Hairs

Won-Rok Kim, Jin Kyu Kim and Antonina Cebulka-Wasilewska¹

(Korea Atomic Energy Research Institute 150 Duckjin-dong, Yusong-gu, Taejon 305-353, Korea, ¹The Henryk Niewodniczanski Institute of Nuclear Physics ul. Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków, Poland)

Abstract - The present study was carried out to investigate the combined effect of radiation and photoperiod (PP) regimes on *Tradescantia* 4430 somatic cell mutations. Potted plants were irradiated with 0.3, 0.5 and 1.0 Gy of gamma radiation from ⁶⁰Co source. The plants irradiated only with gamma radiation were used as control group (CT). The somatic cell mutation rate in 0.5 Gy irradiated CT and PP20 group started to increase on the 6th day and reached a maximum value on the 10th day and 9th day after irradiation while the rate in the experimental group under 4 hours of photoperiod a day (PP4) started to increase on the 10th day and reached a maximal value on the 16th day post-irradiation. The slope of dose-response curve in CT was 5.99 ($r^2=0.99$), while it was 6.93 ($r^2=0.98$) in PP20 and 11.74 ($r^2=0.99$) in PP4, respectively. The biological efficacy of radiation in the induction of pink mutation increased by 15.7% in PP20 and 95.9 % in PP4, respectively. It is suggested that photoperiod regimes unfavorable to the plant have an additive effect on radiation-induced mutations and a delaying or inhibiting effect on cell damage repair, as well. [photoperiod, pink mutation, radiation, *Tradescantia*].