

겨울철 자연환경에 노출된 문주란 잎의 엽록소형광과 항산화효소 활성에 관한 연구

오 순 자 · 고 석 찬*

제주대학교 생명과학과 · 기초과학연구소

Chlorophyll Fluorescence and Antioxidative Enzyme Activity of *Crinum* Leaves Exposed to Natural Environmental Stress in Winter

Soonja Oh and Seok Chan Koh*

Department of Life Science & Research Institute for Basic Sciences,
Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract - Chlorophyll fluorescence and antioxidative enzyme activity were investigated from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* under the natural condition in winter, in order to monitor plant response and physiological states such as vitality, productivity and so on. In the O-J-I-P transients, the fluorescence intensity of J, I, P-step decreased remarkably depending on temperature drop in winter. The photochemical efficiencies of PSII, Fv/Fm, were significantly low in late winter with decrease of Fm. These results indicate that *Crinum* plants were affected by seasonal drop of temperature. The catalase activity significantly decreased depending on temperature drop in winter. However, the activity of superoxide dismutase ascorbate peroxidase and peroxidase slightly increased in winter while some isoenzymes appeared in winter. These results, with the remarkable decrease of Fv/Fm in winter, represent that *Crinum* plants were exposed to oxidative stress and subsequently damaged leading to cell death.

Key words : *Crinum asiaticum* var. *japonicum*, Chlorophyll fluorescence, Antioxidative enzymes, O-J-I-P transients, Low temperature

서 론

식물은 환경요인의 변화에 따라 여러 가지 생리적 변화를 겪으면서 성장한다. 식물이 각종 환경스트레스를 받으면 생체내 산소(O₂)는 반응성이 높은 독성의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 되는데

(Alscher and Hess 1993), 이들은 강한 산화력을 가지고 있어 핵산, 단백질, 지질 등의 변성과 광합성 억제 등 심각한 생리적 장애를 일으키고 식물체를 괴사하게 하기도 한다(Alscher and Hess 1993; Asada 1999). 그러나 식물체가 정상적으로 생장을 유지할 수 있는 것은 독성의 활성산소에 대한 방어기능을 갖고 있기 때문이다(Lidon and Henniques 1993). 활성산소에 대한 식물의 방어기작은 그 형성을 억제하거나 생성된 활성산소를 제거하는 것인데, superoxide dismutase (SOD), peroxidase 등의 항

* Corresponding author: Seok Chan Koh, Tel. 064-754-3528, Fax. 064-756-3541, E-mail. sckoh@cheju.ac.kr

산화효소에 의한 방어기작과 ascorbic acid 등의 저분자 항산화물질에 의한 방어기작으로 구분할 수 있다(Alscher and Hess 1993; Inzé and Van Montagu 1995). 이러한 식물의 방어기작은 스트레스의 강도나 기간 뿐만이 아니라 식물종에 따라서 그 양상이 다르기 때문에 환경스트레스에 대한 식물의 반응 또는 생리적 상태를 확인하는데 사용할 수 있다.

또한 환경스트레스에 대한 식물의 생리적 상태를 진단하는 데에는 광합성능의 변화를 분석하여 활용할 수 있다. 광합성 기구 중에서 광계II 활성이 가장 민감하여 환경스트레스에 대한 지표로 이용되고 있다. 특히, 엽록소형광은 다양한 환경스트레스가 식물 잎의 광계II 활성에 미치는 영향을 쉽고 빠르게 측정할 수 있으며 광합성 기구의 구조 및 기능의 변화를 객관적으로 나타낼 수 있어서, 환경스트레스에 대한 식물의 생리적 반응이나 내성 등을 연구하는데 활용할 수 있다. 엽록소형광을 이용한 광계II 활성의 연구로는 빛에 의한 억제 (Osmond 1994), 일주기적·계절적 변화(오 등 2001), 식물 성장과의 관계 (Lovelock *et al.* 1994) 등이 있으며, 환경요인 변화에 대

한 중간 반응성의 차이, 생리적 반응이나 내성 등을 연구하는데도 활용되고 있다.

환경요인 중에서 온도는 식물의 지리적 분포와 생존, 그리고 생산량의 감소에 직결되는 중요한 요인이다. 특히, 열대 및 아열대 식물들은 저온에 민감하여 10°C 미만의 온도에 노출되면 대사작용에 이상현상이 유발되며 수 시간 또는 수일 내에 식물체에 심각한 파괴 또는 사멸을 초래하게 되는데, 이는 저온이 가해졌을 때 발생하는 활성산소가 주된 원인인 것으로 알려지고 있다(Allen and Ort 2001). 제주도는 다수의 열대 또는 아열대성 식물이 분포하고 있는 북한계선에 해당한다. 따라서 기온, 강수량, 광량 등의 계절적 변화, 특히 겨울철 동안의 낮은 온도가 이들 식물의 생육이나 대사에 영향을 미칠 수 있다. 문주란(*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)은 일본, 한국 등에 분포하고 있는 아열대성 식물이다. 우리나라에서는 제주도에만 분포하고 있는 종으로 복제주근 구좌읍 하도리 산 85번지 토끼섬 일대의 해변사구에 자생하며, 천연기념물 제19호로 지정되어 있다. 문주란이 자생하는 열대 및 아열대 지역에서는 상록성을 유지하지만 제주도에서는 겨울철 저온에 의해 지상부가 고사되기도 한다(Fig. 1).

본 연구는 저온감수성 식물인 문주란을 대상으로 겨울철의 엽록소형광과 항산화효소 활성을 조사하여 겨울철 저온에 의한 아열대성 식물의 반응기구를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서는 복제주근 구좌읍 하도리 토끼섬 (남도) 일대의 해변사구에 자생하고 있는 문주란(*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)을 대상으로 동령의 식물체를 선정하여 외부로 노출되어 자연광을 받는 잎 중에서 엽색이 비슷하고 SPAD값이 50~60의 범위에 해당하는 균일한 상태의 잎을 실험재료로 사용하였다.

2. 기상자료 분석 및 환경요인 조사

문주란 자생지에 인접한 성산포 기상관측소에서 측정 한 기상자료(2001년 7월 1일~2002년 2월 28일) 중 온도, 상대습도, 강수량의 변화를 분석하였다. 그리고 엽록소형광 측정 당시의 조사지역 환경요인으로는 온도, 상대습도, 광량을 조사하였다. 온도와 상대습도는 TR-72 Thermo Recorder (T&D Co. Ltd., Japan)를, 광량은 LI-250 Light Meter (LI-COR Inc., USA)를 이용하여 측정하

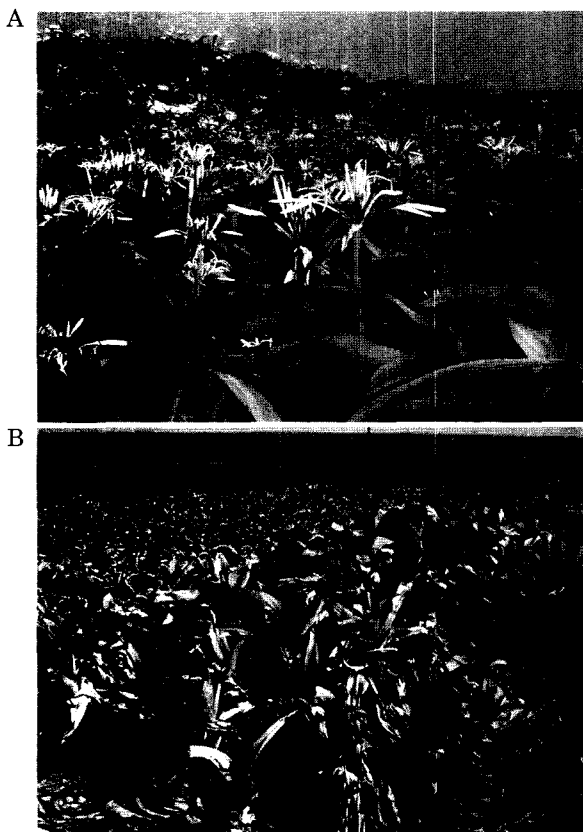


Fig. 1. Healthy leaves in summer (A) and damaged leaves in late winter (B) of *Crinum* plants on the natural habitat.

Table 1. Short description of chlorophyll fluorescence parameters used in the text, according to the O-J-I-P test

Abbreviation	Description
Vt	Relative variable fluorescence at time t
Mo	Slope at the beginning of the transient Fo→Fm, maximal fractional rate of photochemistry
Sm	Normalized area
N	Turn over number of QA
ABS/RC	Absorption flux of photons per active reaction center
TRo/RC	Trapping of electrons per active reaction center
ETo/RC	Electron flux per active reaction center beyond QA ⁻
DIo/RC	Energy dissipation per active reaction center
Φ _{PO}	Maximum yield of primary photochemistry, equal to Fv/Fm
Ψ _O	Probability of a trapped exciton moving an electron beyond QA ⁻
Φ _{EO}	Probability of a absorbed exciton moving an electron beyond QA ⁻
ABS/CS	Absorption flux of photons per cross section
TRo/CS	Trapping of electrons per cross section
ETo/CS	Electron flux per cross section

였다. 기상 조사용 센서는 측정 대상 잎의 높이에 설치하여 10회 반복으로 측정하였다.

3. 엽록소형광의 측정 및 분석

1) O-J-I-P 분석

O-J-I-P 곡선 (polyphasic rise of Chl a fluorescence transients)은 Strasser and Strasser (1995)의 방법에 따라 Plant Efficiency Analyzer (PEA; Hansatech Instrument Ltd., UK)를 이용하여 20회 반복으로 측정하였다. 즉, 15분간 암적응시킨 식물의 잎에 1,500 μmole m⁻² sec⁻¹의 광량을 1초간 조사하여 유도하였다. Time scale은 10 μs에서 1 s의 범위로 설정하고, 10 μs에서 2 ms까지는 1 μs 단위로, 2 ms에서 1 s까지는 1 ms 단위로 인식하도록 설정하였으며, 50 μs (O-단계), 2 ms (J-단계), 30 ms (I-단계), 300 ms (P-단계)에서 엽록소형광 밀도를 분석하였다 (Srivastava *et al.* 1997). O-J-I-P 곡선의 분석으로 8개의 기본적 형광변수(Fo, Fm, Fv/Fo, V_J, V_I, Mo, Sm, N)들을 제시하였으며, 이를 토대로 다시 구조적 변수 (structural parameters; RC/CS, Φ_{PO}, Ψ_O, Φ_{EO} 등)와 기능적 변수 (functional parameters; ABS/RC, TRo/RC, ETo/RC, ABS/CS, TRo/CS, ETo/CS 등)들을 산출하여 제시하였다 (Table 1).

2) 주요 엽록소형광변수의 측정

엽록소형광은 Strasser *et al.* (2000)의 방법에 따라 PEA를 사용하여 two strong light pulse를 이용한 direct fluorescence measurement법으로 측정하였다. 즉, 15분간 암적응시킨 식물의 잎에 10초 간격으로 2회 빛을 조사하여 측정하였다. 측정시에는 1,500 μmole m⁻² sec⁻¹의 광량을 1초 동안 조사하고 측정간에는 150 μmole m⁻²

sec⁻¹의 낮은 광량을 10초 동안 조사하였다(오 등 2001). Fv/Fm, Fo, Fm 등의 변수는 첫번째 측정시의 값으로 나타내었다. 그리고, 1-qN과 1-qP는 첫번째 측정시의 Fo와 Fm, 두번째 측정시의 Fo와 Fm(즉, Fo'와 Fm')을 이용하여 아래의 공식으로 산출하였다 (Strasser *et al.* 2000).

$$1-qN = \frac{(Fm' - Fo')/Fo'}{(Fm - Fo)/Fo}$$

$$1-qP = \frac{Fo' - Fo}{Fm' - Fo'}$$

4. 항산화효소 활성분석

1) 조효소액의 제조

식물체의 잎을 1.0 g씩 취하여 0.1 M Tris-HCl 완충용액 [pH 8.0; 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 25 μM polyvinyl-pyrrolidone (PVP), 0.1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.5% Triton X-100] 10 ml와 함께 얼음 위의 유발에서 마쇄한 후, 4°C에서 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다. 다만 ascorbate peroxidase (APX) 활성을 분석하고자 할 때에는 0.1 M sodium phosphate 완충용액 (pH 7.0; 1 mM PMSF, 5 mM ascorbate, 0.1 mM EDTA)을 사용하여 마쇄하였다.

2) 전기영동

전기영동은 Laemmli (1970)의 방법을 변형하여 native gel 조건에서 실시하였다. 전기영동 시료는 효소액을 동량의 시료용 완충용액 (125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 0.005 % bromophenol blue, 40% glycerol, 5% β-mercaptoe-

thanol)과 혼합하여 사용하였다. Superoxide dismutase (SOD)와 APX는 10% running gel을, catalase와 peroxidase는 7.5%의 running gel을 사용하였으며, stacking gel은 3% gel을 사용하였다. 시료를 vertical slab gel에 loading하여 stacking gel에서는 50 V, running gel에서는 100 V로 전개하였다.

3) 효소활성의 선별염색

SOD활성의 염색은 Beauchamp and Fridovich (1971)의 방법을 변형한 riboflavin/nitro blue tetrazolium방법을 사용하여 실시하였다(오 등 1999). 전기영동이 끝난 겔을 2.45 mM nitro blue tetrazolium (NBT) 용액에 넣어 어두운 곳에 20분간 둔 후, 반응용액(36 mM potassium phosphate, pH 7.8; 28 mM TEMED, 28 μ M riboflavin)에 넣어 암상태에서 15분간 진탕하고, 빛을 조사하면서 5~10분간 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다. SOD isoenzyme 특성을 분석하기 위해서는 전기영동이 끝난 겔을 3 mM H₂O₂ 또는 2 mM KCN 용액에 담가 30분간 진탕한 후 동일한 방법으로 SOD를 검출하였다.

Catalase활성의 검출은 Woodbury *et al.* (1971)의 ferricyanide염색법을 사용하여 실시하였다. 전기영동이 끝난 겔을 3.27 mM H₂O₂가 들어있는 증류수에 넣어 암상태에서 10분간 반응시킨 후 반응용액(3.7 mM ferric chloride, 3 mM potassium ferricyanide)에 넣어 5~10분간 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다.

Peroxidase활성의 검출은 Rao *et al.* (1996)의 방법을 변형하여 실시하였다. 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.8; 10 mM H₂O₂)에 전기영동이 끝난 겔을 10분 동안 담근 후 염색액(1.4 mM 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)에 담가 어두운 곳에서 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다.

APX활성은 Mittler and Zilinskas (1993)의 방법을 사용하여 검출하였다. 전기영동이 끝난 겔을 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0; 2 mM ascorbate)에 넣어 30분 동안 둔 후, 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0; 4 mM ascorbate, 2 mM H₂O₂)에 넣어 20분간 진탕하였다. 겔을 세척한 후 반응용액(50 mM sodium phosphate, pH 7.8; 28 mM TEMED, 2.45 mM NBT)에 넣어 암상태에서 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 자생지의 기상 현황

본 연구를 수행하는 기간 동안의 문주란 자생지(난도)

를 포함하고 있는 성산포 일대의 기상현황을 살펴보았다(Fig. 2). 여름철(7~8월)은 25°C 전후의 높은 기온을 유지하였다. 그러나 9월 중순부터 기온이 점차 낮아지면서 11월부터는 10°C 이하로 현저히 낮아졌다. 특히, 겨울철(12월, 1~2월)에는 월평균 최고기온이 10°C 안팎으로 낮았고, 월평균 최저기온은 2°C 이내로 낮았으며 0°C 이하의 기온을 나타내는 기간도 많았다(자료 미제시). 상대습도는 여름철에 70% 내외의 높은 습도를 유지하였다. 겨울철의 상대습도는 여름철에 비해 다소 낮아지기는 했으나 전반적으로 50~60%를 유지하였다. 강우량은 여름철에 높고 강우의 빈도도 여름철에 많아 상대습도와 유사한 경향을 보였다. 한편, 엽록소형광과 항산화효소활성 분석시의 환경요인을 살펴보면, 온도는 12월 초순 이후

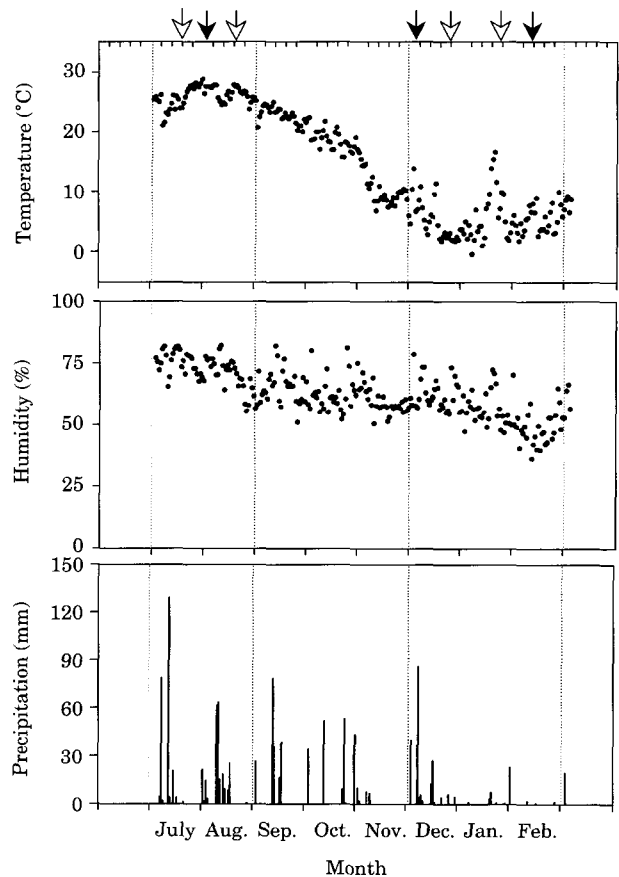


Fig. 2. Seasonal variations of temperature, relative humidity and precipitation determined from July, 2001 to February, 2002 in the Sungsanpo Meteorological Station near natural habitat of *Crinum* plants. The arrows indicate the days when chlorophyll fluorescence was measured and closed arrows indicate the days when antioxidative enzyme activity was assayed. Data were represented as the daily averages.

에 10°C 이하로 크게 낮아졌다. 광량은 0~15 $\mu\text{mole m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 로 극히 낮는데 이는 빛에 대한 영향을 배제하기 위해 새벽(06:00)에 측정하는데서 기인한다. 상대습도는 측정일에 따라서 차이를 보이지만 겨울에는 대략 70% 이상을 나타냈다(자료 미제시). 열대 또는 아열대 식물의 생육 환경요인 중에 온도가 중요하게 작용하여 기온이 10°C 이하가 되면 생장이 멈추고 0°C에서는 죽는 것으로 알려지고 있다(Allen and Ort 2001). Fig. 2에서 보는 바와 같이 겨울철의 10°C 이하로 낮은 저온이 문주란의 생장에 큰 영향을 미치는 것으로 보인다.

2. 겨울철의 엽록소형광 특성

겨울철(12월, 2월)의 새벽(06:00)에 문주란의 O-J-I-P 곡선을 측정하여 여름철(8월) 측정자료와 비교하여 그 특성을 살펴보았다(Fig. 3A). 그 결과, J, I, P-단계에서의 형광세기가 겨울철에 현저하게 감소하였다. 특히 P-단계에서의 형광세기(Fp)는 광계II의 반응중심이 모두 단핵 전자수용체 quinone이 완전히 환원상태에 있을 때의 형광값을 의미하기 때문에 문주란이 스트레스 상태에 놓여

있음을 나타내주고 있다. O-J-I-P 분석을 통해 산출된 형광변수들 중에서 Fm과 Fv/Fo는 겨울철 저온에 의해 점차적으로 감소하였고, Sm과 N은 증가하였다(Fig. 3B). 그리고, 엽면적 당 광계II 활성을 의미하는 변수들 중 ABS/CS와 TRo/CS의 감소, 반응중심의 상대적 밀도를 의미하는 RC/CS와 초기 광화학적 반응의 최대 수득율을 의미하는 Φ_{PO} 는 겨울철에 뚜렷하게 감소하였으며, ABS/RC와 ETo/RC는 크게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3C). 그리고 활력도를 나타내는 변수 중에서는 여름철에 비해 $\Phi_{PO}/(1-\Phi_{PO})$ 의 감소가 특징적이었다(Fig. 3D).

한편, 주요 엽록소형광변수의 변화를 조사한 결과(Fig. 4), 문주란 잎의 광계II 광화학적 효율, 즉 Fv/Fm은 여름철에 비해 겨울철에 크게 낮았다. 일반적으로 Fv/Fm값이 0.8보다 낮을 때는 광계II의 반응중심이 손상을 입은 상태이거나 비가역적인 불활성상태에 처해있는 상태라고 볼 수 있다(Bolhar-Nordenkampf *et al.* 1989). 여름철에는 문주란 잎의 Fv/Fm이 0.84로 스트레스를 받지 않은 건강한 식물 잎이 갖는 값을 나타내었다(Demming and Björkman 1987). 그러나 겨울철에는 12월 초에 0.73의 값을 보였고 중순에 0.51, 1월 중순에 0.61, 그리고 2월

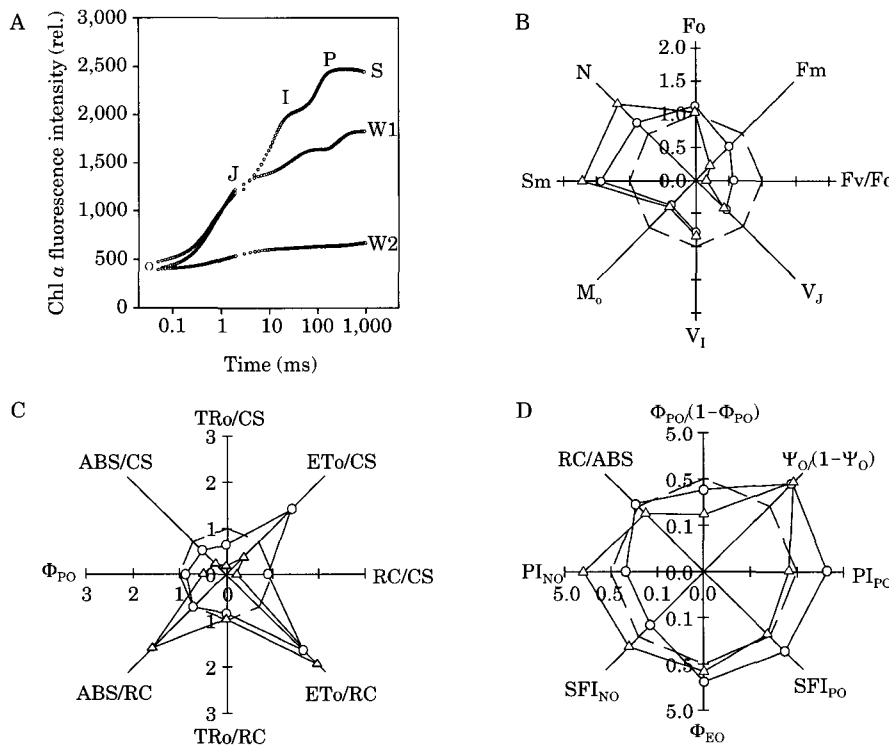


Fig. 3. Fluorescence transients O-J-I-P and spider plots of selected parameters quantifying the behaviour of PSII from leaves of *Crinum* plants under natural conditions. (A) fluorescence transients O-J-I-P, (B) Extracted and technical fluorescence parameters, (C) Quantum efficiencies, activities per reaction centre, effective absorpton per cross section, and (D) Vitality indexes (structure-function and performance indexes). S, summer (August 5; long dash); W1, early winter (December 2; circle); W2, late winter (February 3; triangle).

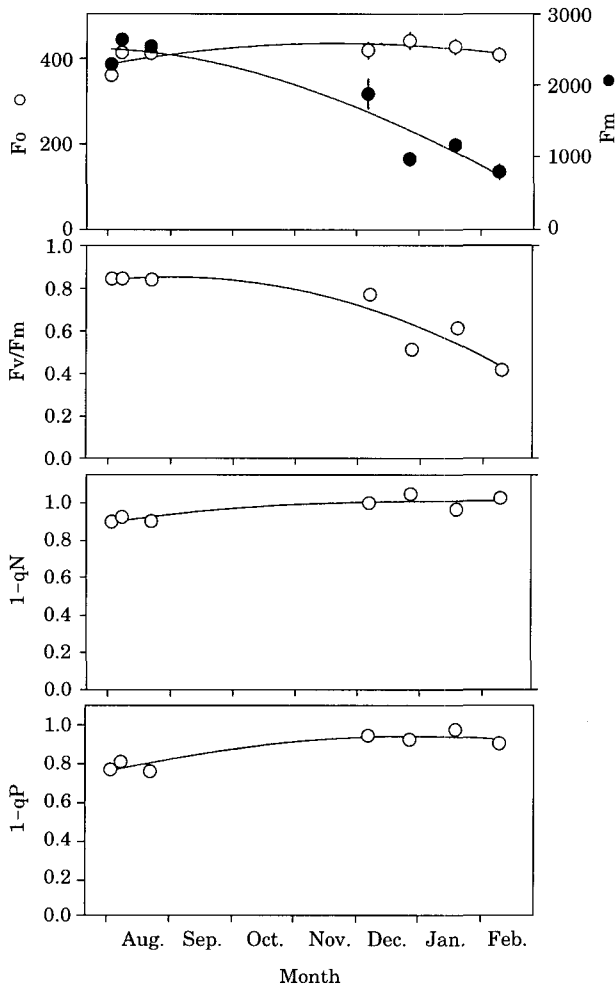


Fig. 4. Seasonal change of chlorophyll fluorescence parameters (F_o , F_m , F_v/F_m , $1-q_N$ and $1-q_P$) from leaves of *Crinum* plants. Chlorophyll fluorescence was measured at dawn (06:00) and the data were represented as the averages \pm SE of 20 independent measurements.

초에 0.41로 겨울철 온도변화 추이와 유사한 경향을 나타내어 저온이 광합성효율에 영향을 미침을 알 수 있다. 저온감수성 식물종들은 저온($0\sim 10^\circ\text{C}$)에 노출되었을 때 광합성효율이 현저하게 감소한다. 즉, 저온내성 식물인 호밀과 완두에서는 저온에 노출되어도 F_v/F_m 의 변화가 없지만, 저온감수성 식물인 옥수수과 오이에서는 종에 따라 차이가 있지만 저온에 노출되면 F_v/F_m 값이 낮아졌다 (Feierabend *et al.* 1992). 문주란은 겨울철에 F_v/F_m 값이 감소하였으므로 저온감수성 식물과 유사한 경향을 보인다고 할 수 있다. 이와 같은 겨울철 문주란의 광합성효율의 저하는 F_o 의 미약한 증가와 F_m 의 감소를 수반하고 있어 광 조건에서의 만성적인 광억제와 유사한 결과를

보여주고 있다. 그리고 이러한 F_m 의 감소와 F_o 의 증가로부터 광수확복합체 (LHC: light harvesting complex)와 광계II 엽록소의 에너지 분배가 저온에 의해 영향을 받고 있으며, 반응중심을 포함한 모든 엽록소분자들의 빛 흡수 용량 역시 감소되고 있음을 알 수 있다 (Flagella *et al.* 1994).

$1-q_N$ 값은 여름철보다 겨울철에 다소 높게 유지되었으나 그 변화폭이 적어 여름철과 겨울철에 비광화학적 소멸되는 형광이 적음을 알 수 있다. 그리고 $1-q_P$ 는 광화학적 형광소멸과 관련이 있는 것으로 여름철에 0.76~0.80, 겨울철에는 0.90~0.97의 값을 보여 온도가 낮은 겨울철이 여름철에 비해 높은 양상을 보였다. 이러한 결과는 여름철보다 겨울철에 광계II 반응중심들이 상대적으로 더 환원되어 있음을 의미한다 (Sonoike 1999). 광계II의 초기 전자수용체 Q_A 의 정류상태에서의 산화-환원 상태는 다양한 생리적 또는 환경적 조건에서 광손상 여부에 영향을 끼칠 수 있는 요인이다. 즉, Q_A 가 산화되어 있고 여기에너지가 전자전달과정에 이용된다면 광손상이 적게 일어나지만, Q_A 가 환원 상태로 존재한다면 광손상이 많이 일어나게 된다 (Huner *et al.* 1996). 따라서, 문주란은 광계II 반응중심들이 여름철에 비해 겨울철에 상대적으로 더 환원되어 있기 때문에 겨울철 낮시간의 광조사에 의해 광손상이 일어날 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

3. 겨울철의 항산화효소 활성의 패턴

겨울철의 SOD, catalase, peroxidase와 APX 등 항산화효소 활성 패턴을 전기영동으로 조사하여 여름철의 활성 패턴과 비교하였다 (Fig. 5). SOD isoenzyme은 전체적으로 7개의 밴드로 검출되었다 (Fig. 5A). SOD 1은 H_2O_2 와 KCN 어느 것에 의해서도 저해되지 않으므로 Mn-SOD로, 나머지 6개의 isoenzyme (SOD 2~SOD 7)은 H_2O_2 와 KCN에 의해 모두 저해되어 CuZn-SOD로 추정할 수 있었다 (자료 미제시). 그 중 2개의 isoenzyme (SOD 3과 SOD 5)은 효소활성에는 차이가 있지만 겨울철에만 특이적으로 검출되었고, SOD 4는 여름철에 특이적으로 검출되는 것으로 나타났다. *Fagus sylvatica*와 *Coleus blumei*을 고온(35°C)과 저온(10°C)에 2일간 노출시켰을 때 저온에서 두 종 모두 SOD활성이 높았고, 특히 열대지방에서 자라는 *Coleus blumei*는 저온에서 SOD활성이 3배 증가하였다 (Peltzer *et al.* 2002). 문주란 잎의 계절별 SOD활성은 큰 차이를 보이지는 않았으나 여름철보다는 겨울철, 특히 늦은 겨울(2월 초)에 다소 높아 겨울철 환경요인에 의해 영향을 받고 있음을 시사한다고 할 수 있

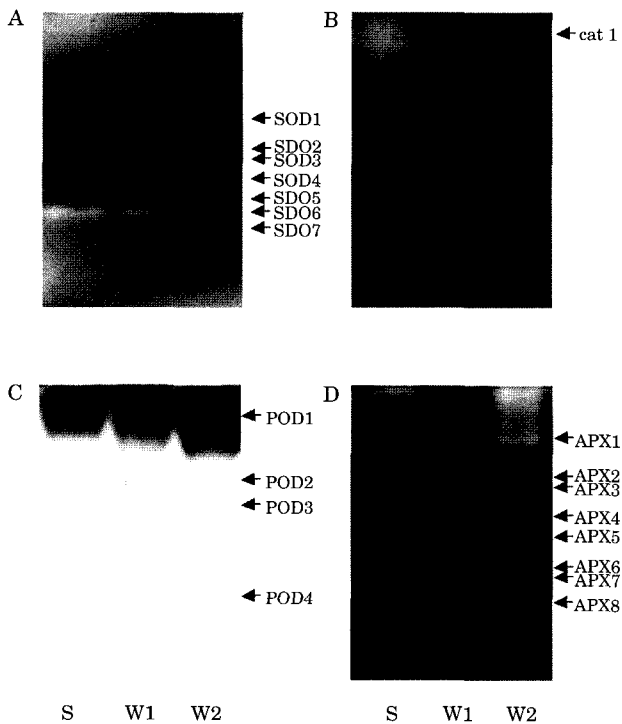


Fig. 5. Isoenzyme profiles of superoxide dismutase (A), catalase (B), peroxidase (C) and ascorbate peroxidase (D) from leaves of *Crinum* plants at dawn (06:00) in summer and winter. S, summer (August 5); W1, early winter (December 2); W2, late winter (February 3).

다. Catalase는 단일 밴드로 검출되었는데 그 활성이 여름철에 비해 겨울철에 매우 낮은 것으로 나타났다(Fig. 5B). Peroxidase isoenzyme은 전체적으로 4개의 밴드로 검출되었다(Fig. 5C). 전반적으로 높은 활성을 지닌 peroxidase 1은 효소활성에는 차이가 있지만 계절에 관계없이 활성이 높게 검출되었으며 겨울철에 특히 높은 활성을 보였다. 그리고 나머지 3개의 isoenzyme (peroxidase 2~4)은 겨울철에만 특이적으로 나타났다. 식물체에서 peroxidase는 바이러스, 미생물, 곰팡이 등의 감염에 의한 생물학적 스트레스 뿐만 아니라 고농도의 염, 상처, 온도 등의 비생물학적 스트레스에 의해서 그 활성이 증가하는 것으로 보고된 바 있다(Van Huystee 1987). 본 연구에서 문주란 잎의 peroxidase 활성은 여름철에 비해 겨울철에 더 높은 활성을 나타내고, 겨울철에 특이적인 isoenzyme들이 나타나고 있어 문주란은 겨울철에 저온 스트레스를 받고 있음을 알 수 있다. 문주란의 계절별 APX isoenzyme 패턴을 살펴보면, 전체적으로 8개의 밴드가 검출되었다(Fig. 5D). 그 중 APX 2는 겨울철에 특이적으로 검출되었고, 나머지 7개의 isoenzyme들은 효소활

성에 다소의 차이는 있지만 계절에 관계없이 나타났으며, 늦은 겨울에 활성이 높아지는 것을 관찰할 수 있었다.

저온 스트레스는 초기의 온도에 의존적인 현상(primary injury event)과 오랜 기간 동안 저온의 누적에 의존적인 현상(secondary injury event)으로 나눌 수 있다(Raison and Lyons 1986). 초기 온도에 의존적인 현상은 식물이 임계온도 이하에 노출되었을 때 나타나기 시작하며, 저온의 누적에 의존적인 이차적인 현상은 임계온도 이하에 노출된 이후 시간의 경과와 함께 증가하거나, 처음 임계온도에 노출되었을 당시에는 영향이 없다가 시간의 경과시 스트레스가 누적되어 나타나는 현상이다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 겨울철 문주란의 잎에서 볼 수 있는 광합성효율의 감소는 이 두 현상을 포함하고 있다. 즉, 저온에 민감한 식물들은 10°C 미만의 온도에 노출되면 우선적으로 광합성 과정이 먼저 영향을 받게 되는데, 초겨울에 Fv/Fm값이 0.8 이하로 낮아져 저온에 의해 광계II의 반응중심이 손상을 입거나 스트레스 조건에 처해 있음을 나타내주고 있다. 그리고 12월 말부터 늦겨울에 이르기까지 Fv/Fm값이 점차적으로 감소하여 0.5 이하로 낮아지는데, 이는 시간이 경과함에 따라 식물체에 가해지는 스트레스의 누적된 결과로 해석할 수 있다. 한편, 열대 및 아열대성 식물들은 저온이 가해졌을 때 적응하지 못하고 죽거나 심한 장애를 받게 되는데, 이는 저온스트레스에 의해 발생하는 활성산소가 작용하기 때문인 것으로 알려져 있다(Hodges *et al.* 1997). 항산화효소들은 스트레스에 의해 과다하게 생성되는 활성산소종을 제거하는 기능을 가지고 있으며, 저분자 항산화제와 마찬가지로 스트레스 하에서의 식물의 생존 또는 내성과 관련이 있다(Foyer *et al.* 1991). Fig. 5에서 보는 바와 같이 문주란의 잎에서 catalase는 여름철에 높은 활성을 나타내었다. 그리고, SOD, peroxidase, APX는 여름철에 비해 겨울철에 다소 높은 활성을 나타내고 겨울철에만 특이적으로 나타나는 isozyme들도 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 저온감수성 식물인 오이를 저온스트레스에 노출시켰을 때 SOD, peroxidase, APX 활성은 증가하였고, catalase 활성은 감소하였다는 보고와 매우 유사하다(Lee and Lee 2000). 따라서 문주란도 저온 스트레스에 노출된 오이와 같이 겨울철 자연환경 조건하에서 저온에 의해 산화적 스트레스를 받고 있으며 이로 인해 Fig. 1에서 보는 바와 같이 잎조직의 세포사멸이 일어나고 있는 것으로 해석할 수 있다. 이는 Figs. 3, 4에서 보는 바와 같이 겨울철의 Fv/Fm의 감소를 비롯한 엽록소형광 변수의 변화로부터 확인할 수 있었다.

적 요

겨울철 저온에 의한 식물의 반응 및 생리적 상태를 확인하기 위해 문주란 (*Crinum asiaticum* var. *japonicum*) 을 대상으로 엽록소형광과 항산화효소 활성의 변화를 조사하였다. O-J-I-P 곡선을 분석한 결과 겨울철에 J, I, P-단계에서의 형광세기가 현저하게 감소하였다. 문주란 잎의 광계II의 광화학적 효율, 즉 Fv/Fm은 겨울철의 온도 변화 추이와 유사하게 낮은 값을 나타내어 겨울철 저온이 스트레스 요인으로 작용하는 것으로 보인다. 그리고, 겨울철에 superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, peroxidase 활성이 다소 증가하였으나 catalase 활성은 여름철에 비하여 크게 낮았다. 이러한 결과는 겨울철의 Fv/Fm의 감소와 함께 문주란이 겨울철 저온에 의해 산화적 스트레스에 처해 있게되며 세포사멸이 일어나는 것으로 해석된다.

사 사

본 연구는 2002년도 제주대학교 발전기금 연구소과제 (기초과학연구소) 학술연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

- 오순자, 고정근, 김응식, 오문유, 고석찬. 1999. 두릅나무과 식물의 SOD활성과 광계 II의 광화학적 효율에 미치는 온도 스트레스와 paraquat의 영향. *환경생물*. 17(2):199-204.
- 오순자, 고정근, 김응식, 오문유, 고석찬. 2001. 한라산 구상나무 잎의 엽록소형광의 일변화와 계절적 변화. *환경생물*. 19(1): 43-48.
- Allen DJ and DR Ort. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci*. 6(1):36-42.
- Alscher RG and JL Hess. 1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton. 174pp.
- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplast: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 50:601-639.
- Beauchamp C and I Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem*. 44:276-287.
- Bolhar-Nordenkampf HR, SP Long, NR Baker, G Öquist, U Schreiber and EG Lechner. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct. Ecol*. 3(4):497-514.
- Demmig B and O Björkman. 1987. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171:171-184.
- Feierabend J, C Schaaf and B Hertwig. 1992. Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiol*. 100:1554-1561.
- Flagella Z, D Pastore, RG Campanile, N Di Fonzo. 1994. Photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and drought tolerance in different durum wheat (*Triticum durum*) cultivars. *J. Agric. Sci. Camb*. 122(2): 183-192.
- Foyer CH, M Lelandais, EA Edwards and PM Mullineaux. 1991. The role of ascorbate in plant, interactions with photosynthesis and regulatory significance. pp.131-144. In *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism* (Pell EJ and KL Steffen eds.), American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Hodges DM, CJ Andrews, DA Johnson and RI Hamilton. 1997. Antioxidant enzymes responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *J. Exp. Bot*. 48:1105-1113.
- Huner NPA, DP Maxwell, GR Gray, LV Savitch, M Krol, AG Ivanov and S Falk. 1996. Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: Redox state of PSII. *Physiol. Plant*. 98:358-364.
- Inzé D and M Van Montagu. 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol*. 6:153-158.
- Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685.
- Lee DH and CB Lee. 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci*. 159:75-83.
- Lidon FC and FS Henniques. 1993. Oxygen metabolism in higher plant chloroplasts. *Photosynthesis* 29:249-279.
- Lovelock CE, M Jebb and CB Osmond. 1994. Photoinhibition and recovery in tropical plant species: Response to disturbance. *Oecologia* 97:297-307.
- Mittler R and BA Zinlinskas. 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem*. 212:540-546.
- Osmond CB 1994. What is photoinhibition? Some insights

- from comparisons of shade and sun plants. pp.1-24. In *Photoinhibition of photosynthesis: From molecular mechanism to the field* (Baker NR and JR Bowyer eds.). BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- Peltzer D, E Dreyer and A Polle. 2002. Differential temperature dependencies of antioxidative enzyme in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiol. Biochem.* 40:141-150.
- Rao MV, G Paliyath and DP Ormrod. 1996. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.
- Sonoike K. 1999. The different roles of chilling temperatures in the photoinhibition of photosystem I and photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 48:136-141.
- Srivastava A, B Guissé, H Greppin and RJ Strasser. 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in PSII of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. *Biochem. Biophys. Acta.* 1320:95-106.
- Strasser BJ and RJ Strasser. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. pp.977-980. In: Mathis P (Ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Vol. V. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Strasser RJ, A Srivastava and M Tsimilli-Michael. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. pp.445-483. In *Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation* (Yunus M, U Pathre and P Mohanty, eds.), Taylor and Francis, London & New York.
- Van Huystee RB 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase: Biosynthetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:205-219.
- Woodbury W, AK Spencer, MA Sthamann. 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzyme. *Anal. Biochem.* 44:301-305.

Manuscript Received: January 8, 2003

Revision Accepted: February 19, 2004

Responsible Editorial Member: Joo-Hwan Kim
(Daejeon Univ.)