

겨울철 저온스트레스에 의한 문주란 잎의 항산화효소 활성과 O-J-I-P 곡선 패턴

오 순 자* · 고 석 찬

제주대학교 생명과학과 · 기초과학연구소

Antioxidative Enzyme Activities and O-J-I-P Transients of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* B_{AK}. Leaves under Winter Stress

Soonja Oh* and Seok Chan Koh

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

Abstract - The diurnal and seasonal variations of antioxidative enzyme activity and the O-J-I-P transients were investigated from the leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* under winter stress in natural habitat, in order to diagnose quantitatively physiological states of plants under stresses. The activities of superoxide dismutase and peroxidase increased slightly in winter. Especially, peroxidase activity was higher at dawn and night in winter and some isoforms were detected only in early winter. In the O-J-I-P transients, the fluorescence intensity of J, I, P steps decreased significantly in winter season, contrary to its high value in summer season. Of the chlorophyll fluorescence parameters derived from the O-J-I-P transients, Fm and Φ_{PO} decreased with the increase of ABS/RC depending on temperature drop in winter.

Key words : antioxidative enzymes, chlorophyll fluorescence partameters, *Crinum asiaticum* var. *japonicum*, O-J-I-P transients, winter stress

서 론

자연조건 하에서 식물은 저온이나 고온, 염분, 건조 등 환경요인의 변화에 따라 여러 가지 생리적 변화를 겪으면서 성장한다. 하지만 예기치 못한 환경요인의 변화는 식물체에 손상을 가하고 경우에 따라서는 고사를 유발하기도 한다. 온대지방에서는 기온, 강우량, 광량 등이 계절적으로 뚜렷하게 변하기 때문에 이들 환경요인이 식

물의 생육이나 대사에 영향을 미칠 수 있다. 특히, 겨울철의 저온은 식물의 생육을 제한하거나 생산성을 낮추는 요인으로 작용할 뿐만 아니라, 식물의 지리적 분포와 생존에 직결되는 중요한 환경인자이다. 식물은 저온에 대한 적응정도에 따라서 저온감수성, 저온저항성, 그리고 동결저항성 식물체로 구분할 수 있다. 저온에 가장 민감하게 반응하는 식물들은 열대 및 아열대성 식물들로서 10°C 미만의 온도에 노출되면 대사작용에 이상이 유발되며 수시간 또는 수일 내에 식물체에 심각한 파괴 또는 사멸이 초래되기도 한다(Allen and Ort 2001). 이는 저온이 가해졌을 때 발생하는 활성산소가 주된 원인인 것

*Corresponding author: Soonja Oh, Tel. 064-754-2326/3528,
Fax. 064-756-3541, E-mail. osoonja@cheju.ac.kr

으로 알려지고 있다. 식물이 저온에 노출될 때 우선적으로 광합성 과정이 영향을 받게 되며, 광합성은 식물세포의 가장 중요한 대사과정 중 하나로서 환경요인에 따라 매우 민감하게 반응한다(Hetherington *et al.* 1989). 저온에 의한 광합성능의 감소는 단백질 합성 및 엽록소 생성속도의 저하, 광산화에 의한 색소 표백화, 틸라코이드 막 지질 및 단백질 조성의 변화 등을 수반하여 일어나는 것으로 알려져 있다(Powles 1984; Öquist *et al.* 1987).

제주도는 다수의 열대 또는 아열대성 식물이 분포하고 있는 북방한계선에 해당하기 때문에, 겨울철 저온에 의해 이들 식물들이 영향을 받을 수 있다. 문주란(*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)은 일본, 한국 등에 분포하고 있는 아열대성 식물이며, 우리나라에서는 제주도에만 분포하고 있다. 문주란이 자생하는 열대 및 아열대 지역에서는 상록성을 유지하지만 제주도에서는 겨울을 지내는 동안 지상부가 고사하여 겨울철 저온이 문주란의 생육에 심각한 영향을 미치는 것으로 보인다. 문주란이 겨울철에 반복적으로 저온에 노출됨으로써 catalase 활성의 감소 및 superoxide dismutase와 peroxidase 활성이 증가하고 광계 II의 광화학적 효율을 의미하는 Fv/Fm이 감소하는 것으로 보고된 바 있어(오와 고 2004a), 문주란이 겨울철 환경에 민감하게 반응하고 있음을 알 수 있다. 더욱이, 광계 II의 광화학적 효율의 저하는 D1 단백질의 분해와 관련이 있는 것으로 알려지고 있다(Rintamäki *et al.* 1995). 문주란은 겨울철에 D1 단백질과 이를 암호화하고 있는 *psbA* 유전자의 발현이 낮아지는 것으로 보고된 바 있어(오와 고 2004b), 저온이 광합성능의 감소와 단백질 합성의 저하를 초래함을 알 수 있다. 특히, 광합성능의 감소는 엽록소형광 분석으로 간편하게 알 수 있는데, 주로 Fo, Fm, Fv/Fm값의 변화로 나타내고 있다. O-J-I-P 곡선 (polyphasic rise of Chl *a* fluorescence transients)은 Fo에서 Fm으로의 미세한 형광방출을 나타낸 것으로 이 곡선의 변화를 정밀 분석함으로써 환경스트레스 하에서의 식물의 생리적 상태를 파악할 수 있다.

따라서 본 연구는 저온감수성 식물인 문주란을 대상으로 겨울철 환경조건 하에서 항산화효소의 활성과 O-J-I-P 패턴의 변화 양상을 비교·분석함으로써 겨울철 저온이 식물체에 미치는 영향을 정량적으로 나타내고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서는 복제주근 구좌읍 하도리 토끼섬(난도) 일대의 해변사구에 자생하고 있는 문주란(*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)을 대상으로 동령의 식물체를 선

정하였으며, 외부로 노출되어 자연광을 받는 잎 중에서 잎색깔이 비슷하고 엽록소계 (SPAD-502, Minolta Co. Ltd., Japan)를 사용하여 측정된 SPAD값이 50~60의 범위에 해당하는 잎을 실험재료로 사용하였다.

2. 환경요인 조사

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 측정하였다. 이들 기상 조사용 센서는 측정 대상 잎의 높이에 설치하였으며 10회 반복하여 측정하였다.

3. 항산화효소 활성 분석

1) 조효소액의 제조

식물체의 잎을 1.0 g 씩 취하여 0.1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0; 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 25 μ M polyvinyl-pyrrolidone (PVP), 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5% Triton X-100) 10 mL와 함께 얼음 위의 막자사발에서 마쇄한 후, 4°C에서 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 상침액을 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 -mercaptoethanol)과 혼합하여 사용하였다. 전기영동은 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

항산화효소는 SOD, catalase, peroxidase와 APX를 중심으로 발색반응으로 확인하였다. SOD 활성의 염색은 Beauchamp와 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. Catalase 활성의 검출은 Woodbury 등(1971)의 ferricyanide 염색법을 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. Peroxidase 활성의 검출은 Rao 등(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. APX 활성은 Mittler와 Zilinskas (1993)의 방법을 사용하여 검출하였다. 전기영동이 끝난 겔을 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.0; 2 mM ascorbate)에 넣어 30분 동안 진탕하고, 다시 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.0; 4 mM ascorbate, 2 mM H₂O₂)에 넣어 20분간 진탕하였다. 겔을 세척한 후 다시 반응용액 (50 mM sodium phosphate, pH 7.8; 28 mM TEMED, 2.45 mM NBT)에 넣어 암상태에서 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다.

4. O-J-I-P 분석

O-J-I-P 곡선 (polyphasic rise of Chl *a* fluorescence transients)은 15분간 광을 차단하여 암적응시킨 식물의 잎에 Plant Efficiency Analyzer (PEA; Hansatech Instrument Ltd., UK)를 이용하여 1,500 μ mole m⁻² sec⁻¹의 광량을 1초간 조사하여 유도하였으며 (Strasser and Strasser 1995), 새벽 (06:00), 낮 (12:00)과 밤 (20:00)에 20회 반복하여 측정하였다. Time scale은 10 μ s에서 1 s의 범위로 설정하고, 10 μ s에서 2 ms까지는 1 μ s 단위로, 2 ms에서 1 s까지는 1 ms 단위로 인식하도록 설정하였으며, 50 μ s (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, VJ, VI, (dv/dt)o, Sm, N)들을 제시하였다. 그리고 이를 토대로 다시 구조적 변수 (structural parameters; RC/CS, Φ po, Φ o, Φ eo)와 기능적 변수 (functional parameters; ABS/RC, TRo/RC, ETo/RC, ABS/CS, TRo/CS,

Table 1. Short description of chlorophyll fluorescence parameters used in the text, according to the JIP-test

Abbreviation	Description
Fo	Initial fluorescence in dark adapted tissue
Fm	Maximum fluorescence in dark adapted tissue
Fv/Fo	Ratio of photochemical and non-photochemical de-excitation fluxes of excited chlorophyll
Vt	Relative variable fluorescence at time t
(dv/dt)o	Slope at the beginning of the transient Fo \rightarrow Fm, maximal fractional rate of photochemistry
Sm	Normalized area
N	Turn over number of Q _A
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 Q _A ⁻
Φ po	Maximum yield of primary photochemistry, equal to Fv/Fm
Ψ o	Probability of a trapped exciton moving an electron beyond Q _A ⁻
Φ eo	Probability of a absorbed exciton moving an electron beyond Q _A ⁻
RC/CS	Active reaction center per cross section
ABS/CS	Absorption flux of photons per cross section
TRo/CS	Trapping of electrons per cross section
ETo/CS	Electron flux per cross section
SFIpo	Responds to structural and functional PS II event leading to electron transport within photosynthesis
PIPo	Ratio of the two structure functional indexes (SFIpo and SFIo)

ETo/CS)들을 산출하여 제시하였다 (Table 1).

결 과

1. 자생지 환경요인의 일변화

문주란 자생지의 겨울철 온도, 상대습도, 광량의 일변화를 조사하여 여름철의 조사자료와 비교하였다 (Fig. 1). 겨울철 문주란 자생지의 기상은 급작스런 눈이나 비 등으로 인해 그 변화폭이 큰 편이다. 이러한 기상변화는 먹구름을 동반하기 때문에 광량에 영향을 미쳐 낮시간에도 일시적으로 광량의 저하를 야기하였다. 겨울철의 광량은 12시에 가장 높게 나타났다. 측정일에 따라 차이가 있지만 겨울철에는 낮시간에 대략 500~600 μ mole m⁻² sec⁻¹로 나타나 8월초 낮시간의 750 μ mole m⁻² sec⁻¹에 비해 낮았다. 겨울철 온도는 광량이 많은 낮시간에 다소 높고, 새벽과 밤에는 하강하여 일교차가 큰 것으로 나타났다. 즉, 초겨울 (12월초)에는 새벽부터 밤에 이르기까지 전반적으로 10°C 이상의 온도를 보였으며, 낮시간

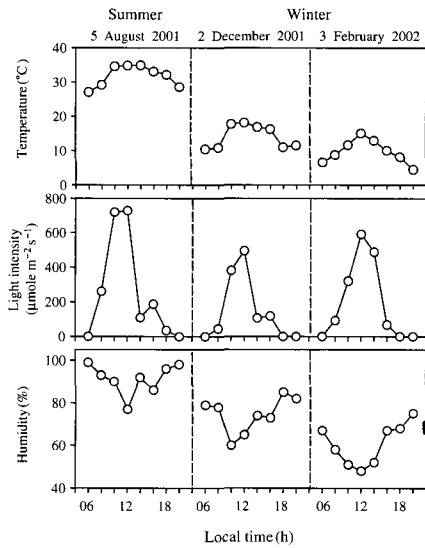


Fig. 1. Diurnal variations of temperature, light density and relative humidity in the natural habitat of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* in summer and winter. The values represent the averages of 10 independent measurements.

에 최고 온도인 18.2°C로 나타났다. 그리고 늦은 겨울(2월초)에는 새벽과 밤에는 10°C 이내의 온도를 보였으며, 낮시간에는 15.1°C를 나타내었다. 8월초 일평균온도가 25°C 이상을 유지하고 있어 겨울철 온도가 크게 감소하였음을 알 수 있으며, 겨울철 밤과 낮의 일교차가 대략 10°C 정도의 차이를 보였다. 겨울철의 상대습도는 여름철에 비해 큰 폭으로 감소하였고 광량이 많은 낮시간에 낮아졌다가 밤에는 다시 증가하는 양상을 보였다.

2. 항산화효소 활성의 변화

겨울철 저온이 문주란에 미치는 영향을 살펴보기 위해 초겨울(12월초)과 늦은 겨울(2월초)에 문주란 잎의 항산화효소 isoenzyme 패턴을 조사하여 여름철(8월초)의 것과 비교하였다(Fig. 2).

SOD는 전체적으로 7개의 밴드가 관찰되었으며, 이들은 H₂O₂와 KCN에 의한 선택적 저해로부터 1개의 Mn-SOD와 6개의 CuZn-SOD로 구분할 수 있었다(Fig. 2A). 각 조사시기의 일변화에 있어서 이들 isoenzyme의 효소 활성은 뚜렷한 차이를 보이는데, 특히 Mn-SOD는 2월초 즉, 늦은 겨울에 활성이 증가하였다. 하지만 CuZn-SOD 3은 겨울철에 관찰되지 않았다. 그리고 다른 isoenzyme의 활성도 조사시기에 따라 또는 일주기에 따라 차이를 보이는데 초겨울에는 새벽과 밤, 그리고 낮에 관계없이 여름철과 유사한 활성을 보이는데 반해, 늦은 겨울에는 Mn-SOD와 CuZn-SOD 4와 5의 활성이 낮에

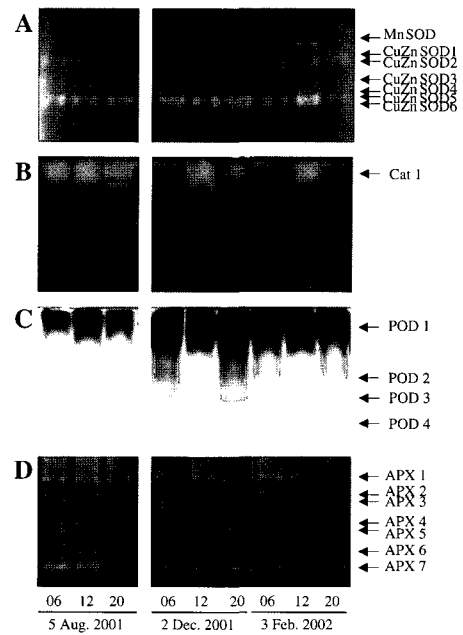


Fig. 2. Diurnal changes of antioxidant enzyme activities of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* leaves at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter. A, superoxide dismutase; B, catalase; C, peroxidase; D, ascorbate peroxidase.

증가하였다. Catalase는 단일 밴드로 검출되었으며, 그 활성은 겨울철에 다소 감소하는 양상을 보였다. 그리고 일변화에 있어서는 여름철에는 뚜렷한 차이를 보이지 않으나, 겨울철에는 저온의 반복적인 노출과 관계없이 낮시간에 여름철과 유사한 높은 활성을 보였으며, 새벽과 밤에는 낮았다(Fig. 2B). Peroxidase는 전체적으로 4개의 밴드가 관찰되었으며(Fig. 2C), 12월초에 높은 활성을 나타내었으나 2월초에 감소하는 경향을 보였으며, peroxidase 3과 4는 초겨울에만 특이적으로 검출되었다. 이들 isoenzyme의 일변화적 특성을 살펴보면 8월초에는 peroxidase 1만이 관찰되며 낮시간에 다소 높은 활성을 보였는데 반해, 겨울철에는 12월초와 2월초 모두 낮에 비해 새벽과 밤에 높은 활성을 보였다. APX는 전체적으로 7개의 밴드가 검출되었으며, 초겨울에는 새벽과 밤에 높은 활성을 보이고 늦은 겨울에는 낮에 높은 활성을 보였다(Fig. 2D).

3. O-J-I-P 분석

문주란 잎에서 광합성장치의 행동의 일변화를 O-J-I-P 곡선으로 나타내었다(Fig. 3). 그 결과, 겨울철 J, I, P-단계에서의 형광세기가 여름철에 비해 현저하게 감소하였다. 그리고 각각의 측정시기에 있어서 새벽과 밤

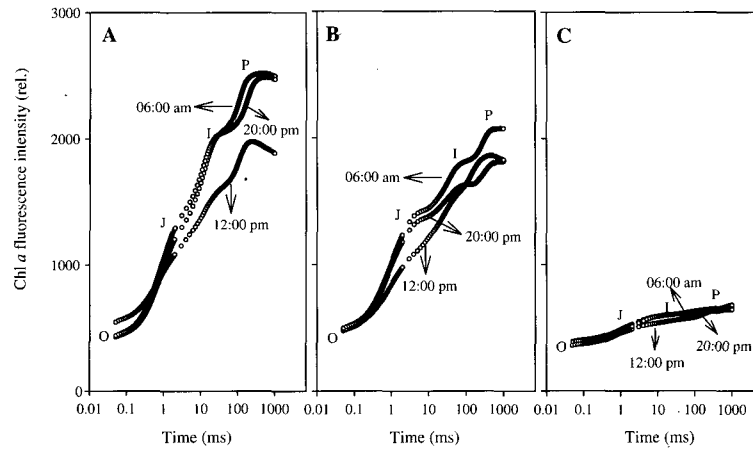


Fig. 3. Diurnal changes of O-J-I-P transients from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* on the natural habitat in summer and winter. (A) 5 August 2001, (B) 2 December 2001, (C) 3 February 2002.

Table 2. The values of experimental expressions derived from O-J-I-P transients presented in Fig. 2

Parameters	5 August 2001			2 December 2001			3 February 2002		
	06:00	12:00	20:00	06:00	12:00	20:00	06:00	12:00	20:00
Temperature (°C)	26.1	36	27.9	10.5	18.2	11.6	6.6	15.1	4.5
Humidity (%)	99	77	98	79	65	82	67	48	75
Light intensity ($\mu\text{mole m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)	0.71	728.5	0	0	495.4	0	0	591.5	0
F extremes									
Fo	413 ± 8.5	615 ± 53.1	403 ± 5.8	443 ± 19.0	482 ± 31.6	465 ± 13.9	404 ± 17.3	436 ± 39.5	358 ± 10.9
Fm	2662 ± 69.1	2020 ± 48.6	2591 ± 50.0	1814 ± 202.3	1827 ± 165.4	2076 ± 100.8	785 ± 103.9	741 ± 63.7	678 ± 42.9
Fv/Fo	4.9 ± 0.08	2.4 ± 0.30	4.9 ± 0.05	2.8 ± 0.35	2.7 ± 0.26	3.2 ± 0.15	0.8 ± 0.13	0.7 ± 0.06	0.9 ± 0.08
F dynamics									
V _J	0.90 ± 0.008	0.86 ± 0.013	0.83 ± 0.004	0.52 ± 0.012	0.37 ± 0.020	0.47 ± 0.010	0.50 ± 0.019	0.38 ± 0.020	0.46 ± 0.01
V _I	0.99 ± 0.002	0.92 ± 0.013	0.99 ± 0.001	0.77 ± 0.008	0.67 ± 0.013	0.72 ± 0.013	0.81 ± 0.010	0.65 ± 0.022	0.77 ± 0.013
(dv/dt) _o	1.13 ± 0.034	1.15 ± 0.077	1.17 ± 0.034	0.54 ± 0.039	0.41 ± 0.020	0.44 ± 0.010	0.58 ± 0.024	0.45 ± 0.020	0.47 ± 0.020
Areas									
Sm	38.5 ± 1.55	33.0 ± 1.87	40.1 ± 1.37	56.9 ± 3.40	50.3 ± 4.75	56.4 ± 2.43	68.2 ± 5.67	98.5 ± 20.7	83.1 ± 6.67
N	44.9 ± 1.50	43.9 ± 3.98	56.4 ± 2.03	59.9 ± 6.59	56.2 ± 5.83	52.1 ± 1.62	79.0 ± 6.70	119.1 ± 24.1	85.3 ± 7.63

의 O-J-I-P 곡선은 거의 유사한 패턴을 보이는데 반해, 낮에는 전반적으로 낮아졌으며, 특히 J-단계와 I-단계의 감소는 8월초와 겨울철에 공통적인 현상으로 나타났다. 초겨울(12월초) 문주란 잎의 O-J-I-P 곡선을 분석하여 광계 II 전자수용체의 연속적인 환원과정을 비교해 보면 (Fig. 3B), P-단계에서의 형광세기 (Fp)는 새벽이나 밤, 낮에 관계없이 높게 유지되었는데, 새벽과 밤의 형광 세기가 늦은 겨울에 비해 대략 3배 더 높았다. 특히 새벽과 밤의 초기유도곡선은 거의 유사한 패턴을 나타내었고, 낮의 초기유도곡선은 새벽과 밤의 초기유도곡선과는 약간의 차이를 보였다. 먼저 O-J구간의 초기 기울기가 낮에 조금 낮아졌다. 그리고 J-I구간의 변화는 적었으며, I-P구간의 변화는 유사하였다. 늦은 겨울(2월초)에

는 J, I, P-단계에서의 엽록소형광 세기가 초겨울에 비해 크게 감소하였으며, 일변화에 있어서는 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3C).

Fig. 3의 O-J-I-P 곡선으로부터 엽록소형광의 주요 변수들을 산출하였다 (Table 2). 그 결과, 겨울철 문주란 잎의 Fm값은 여름철에 비해 상당히 낮으며, 늦은 겨울에 그 값은 큰 폭으로 감소하였다. 그리고 Fv/Fo 값도 겨울철에 크게 감소하였다. 그러나 이들 변수들은 초겨울과 늦은 겨울의 일변화에 있어서는 의미있는 차이를 보이지 않았다. 하지만 Fo와 Fm사이의 J-단계와 I-단계에서의 미세한 변이형광 (V_J, V_I)과 기울기 (dv/dt)_o를 살펴보면, 이들 변이형광은 낮시간에 다소 감소하였다. 면적을 의미하는 변수들 (Sm과 N)은 겨울철에 증가하였

Table 3. The values of the structural and functional parameters calculated from O-J-I-P transients in Fig. 2 and the data in Table 2

Parameters	5 August 2001			2 December 2001			3 February 2002		
	06:00	12:00	20:00	06:00	12:00	20:00	06:00	12:00	20:00
Temperature (°C)	26.1	36	27.9	10.5	18.2	11.6	6.6	15.1	4.5
Humidity (%)	99	77	98	79	65	82	67	48	75
Light intensity ($\mu\text{mole m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)	0.71	728.5	0	0	495.4	0	0	591.5	0
Fluxes-activities/RC									
ABS/RC	1.51±0.05	2.00±0.18	1.70±0.05	1.52±0.17	1.59±0.09	1.23±0.03	3.37±0.49	3.16±0.26	2.48±0.22
TRo/RC	1.26±0.04	1.33±0.09	1.41±0.04	1.03±0.07	1.12±0.04	0.93±0.02	1.17±0.04	1.19±0.03	1.02±0.03
ETo/RC	0.21±0.01	0.17±0.01	0.25±0.01	0.49±0.03	0.70±0.04	0.49±0.02	0.58±0.04	0.75±0.04	0.55±0.02
Fluxes ratios (Yields)									
Φ_{po}	0.83±0.01	0.68±0.03	0.83±0.001	0.71±0.03	0.71±0.02	0.76±0.01	0.41±0.03	0.41±0.02	0.45±0.02
Ψ_o	0.17±0.01	0.14±0.01	0.17±0.01	0.48±0.01	0.63±0.02	0.53±0.01	0.50±0.02	0.62±0.02	0.54±0.01
Φ_{eo}	0.13±0.01	0.09±0.01	0.14±0.01	0.34±0.02	0.45±0.02	0.40±0.01	0.20±0.01	0.25±0.02	0.24±0.01
Density of RCs									
RC/CSo	300±12.6	330±26.2	248±18.2	346±39.9	319±19.4	403±8.1	160±22.7	153±18.7	165±14.1
RC/CSm	1788±95.6	1116±139.7	1542±64.8	1427±263.3	1200±145.3	1695±85.2	345±82.2	270±37.0	326±39.4
Fluxes-activities/CS									
ABS/CSo	449±10.0	636±52.7	437±6.5	474±19.8	501±32.9	495±15.7	410±19.7	437±39.9	359±11.4
TRo/CSo	373±8.4	423±19.6	363±5.6	336±21.9	355±22.8	375±12.9	176±22.4	172±15.6	163±11.5
ETo/CSo	67±3.0	59±7.01	62±1.1	160±10.2	224±17.5	199±9.0	82±7.6	104±7.4	86±5.1
ABS/CSm	2662±69.1	2020±48.6	2591±50.0	1814±202.3	1827±165.4	2076±100.8	785±103.9	741±63.7	678±42.9
TRo/CSm	2213±62.1	1384±71.6	2154±44.2	1340±193.2	1326±151.1	1580±90.8	375±86.4	304±33.4	319±34.4
ETo/CSm	375±12.2	187±16.1	366±8.4	635±89.3	844±108.3	845±61.4	166±30.4	182±17.5	168±16.3
Vitality indexes									
10*SF _{Ipo}	0.95±0.05	0.50±0.06	0.84±0.04	2.6±0.33	2.94±0.25	3.31±0.16	0.78±0.10	0.92±0.10	1.14±0.11
(RC/ABS)	0.67±0.03	0.54±0.06	0.59±0.02	0.73±0.07	0.65±0.03	0.82±0.02	0.37±0.03	0.35±0.02	0.45±0.03
$\Phi_{po}/(1-\Phi_{po})$	4.93±0.08	2.39±0.30	4.92±0.05	2.80±0.35	2.66±0.26	3.19±0.15	0.82±0.13	0.72±0.06	0.87±0.08
$\Psi_o/(1-\Psi_o)$	0.20±0.01	0.16±0.02	0.21±0.01	0.93±0.04	1.72±0.12	1.14±0.05	1.04±0.08	1.79±0.16	1.20±0.05
PI _{po}	0.52±0.05	0.21±0.04	0.60±0.03	2.04±0.38	3.15±0.50	3.06±0.30	0.31±0.06	0.50±0.11	0.50±0.07

으며, 초겨울의 일변화에 있어서는 별로 차이를 나타내지 않았다. 하지만 늦은 겨울에는 이들 변수들이 낮시간에 증가하였다.

Fig. 3의 O-J-I-P 곡선과 Table 2의 주요 변수로부터 여러 가지 구조적·기능적 형광변수들을 산출하였다 (Table 3). 반응중심 당 광계 II 활성 (fluxes activities/RC) 을 의미하는 변수들 중에 ABS/RC가 초겨울보다는 늦은 겨울에 2배 정도 증가하였다. TRo/RC와 ETo/RC는 초겨울과 늦은 겨울에는 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 여름철에 비해 TRo/RC는 겨울철에 다소 감소하였으며, ETo/RC는 증가하였다. 그리고 겨울철 일변화에 있어서 이들 변수들의 변화양상을 비교해 보면, ABS/RC와 TRo/RC의 일변화는 거의 없으나 ETo/RC가 낮시간에 증가하였다. 광계 II 형광수율 (flux ratios 또는 yields) 을 의미하는 변수들 중에 Φ_{po} 는 겨울철 저온에 노출되는 기간이 길어짐에 따라 대략 50% 감소하였다. 그리고, Φ_{po} 는 각각의 일변화에 있어서는 차이를 보이지 않지만 나머지 변수들은 전반적으로 낮시간에 다소 증가하는 경향을 보였다. 엽면적 당 활성상태의 반응중심 밀도 (density of RCs)를 나타내는 변수 중 RC/CSo와 RC/

CSm는 저온의 반복적인 노출에 의해 각각 50%, 25%로 감소하였으며, 각각의 일변화에 있어서는 낮에 다소 감소하였다가 밤에 증가하였다. 한편, 겨울철 엽면적 당 광계 II 활성 (activities/CS)을 살펴보면, 열린 상태에서의 변수들 (ABS/CSo, TRo/CSo, ETo/CSo)과 닫힌 상태에서의 변수들 (ABS/CSm, TRo/CSm, ETo/CSm) 모두 늦은 겨울에 큰 폭으로 감소하였으며, 각각의 일변화에 있어서는 낮에 다소 증가하였다. 마지막으로 활력도 (vitality index) 를 나타내는 변수들은 늦은 겨울철 큰 폭으로 감소하였으며, 특히 10*SF_{Ipo}, $\Phi_{po}/(1-\Phi_{po})$, PI_{po}는 각각 30%, 30%, 15%로 감소하였다. 각각의 일변화에 있어서는 큰 의미를 보이지 않았으나 $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ 가 낮에 다소 증가하는 것으로 조사되었다.

고 찰

겨울철 저온은 열대 및 아열대성 식물의 성장과 발달에 영향을 미친다. 열대 및 아열대성 식물들은 저온이 가해졌을 때 적응하지 못하고 죽거나 심한 장애를 받게 되는데, 이는 저온스트레스에 의해 발생하는 활성산소가

작용하기 때문인 것으로 알려지고 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. 2에서 보는 바와 같이 늦은 겨울에 Mn-SOD와 CuZn-SOD 4와 5의 활성이 낮에 증가하였다. Catalase 활성은 겨울철에 다소 감소하는 양상을 보였지만, 일변화에 있어서는 초겨울과 늦은 겨울에 모두 낮시간에 여름철과 유사한 높은 활성을 보였고 새벽과 밤에는 낮았다. Peroxidase 활성은 여름철에 비해 겨울철에 더 높은 활성을 나타내고, 겨울철에 특이적인 isoenzyme들이 나타나고 있다. 더군다나 peroxidase isoenzyme의 일변화적 특성을 살펴보면 8월초에는 peroxidase I만이 관찰되며 낮시간에 다소 높은 활성을 보였는데 반해, 겨울철에는 12월초와 2월초 모두 낮에 비해 새벽과 밤에 높은 활성을 보였다. APX는 전체적으로 7개의 밴드가 검출되었으며, 초겨울에는 새벽과 밤에 높은 활성을 보이고 늦은 겨울에는 낮에 높은 활성을 보였다. 이러한 결과는 저온 감수성 식물인 오이를 4°C 저온에서 배양했을 때 SOD, peroxidase, APX 활성이 증가하고 catalase 활성이 감소하였다는 보고와 유사하여(Lee and Lee 2000) 문주란이 겨울철 저온의 영향을 받고 있음을 알 수 있다. 그리고, Fig. 1에서 보는 바와 같이 조사지역 환경요인 중에 온도와 상대습도의 변화가 크며, 특히 온도는 겨울철 새벽과 밤에 식물의 생장에 영향을 미칠 수 있는 낮은 온도, 즉 10°C 이내의 온도를 나타내고 있어, 항산화효소의 활성 및 발현양상은 생육조건에서의 환경의 영향을 반영한다고 할 수 있다.

문주란의 O-J-I-P 곡선 패턴을 살펴보면, 겨울철 J, I, P-단계에서의 형광세기가 여름철에 비해 현저하게 감소하였다(Fig. 3). 이 중 P-단계에서의 형광세기는 광계 II의 반응중심이 모두 닫혀 전자수용체 quinone이 완전히 환원상태에 있을 때의 형광값을 의미하기 때문에 겨울철에 문주란이 스트레스 상태에 놓여 있음을 나타내 주고 있다. 그리고, 초겨울 새벽과 밤의 O-J-I-P 곡선은 밤에 I와 P-단계에서 다소 감소하지만 거의 유사한 패턴을 보이며 낮에는 J-단계에서 낮아졌다(Fig. 3B). 이는 겨울철 새벽과 밤에 비해 낮시간에 환원상태의 Q_A (즉, Q_A^-)가 Q_B 로의 전자전달이 원활하게 이루어지고 있지 않음을 의미한다. 늦은 겨울에는 J, I, P-단계에서의 엽록소형광 세기가 초겨울에 비해 크게 감소하였으며 일변화에 있어서는 차이를 보이지 않았다(Fig. 3C). Table 2와 3의 O-J-I-P 곡선으로부터 산출된 주요 형광변수들 중에 Fm, Fv/Fo, Φ_{PO} , RC/CSm, ABS/CSm, TRo/CSm,

$\Phi_{PO}/(1-\Phi_{PO})$ 등은 여름철에 비해 겨울철에 감소하였으며, Sm, N, ABS/RC, ETo/RC, $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ 등은 증가하는 양상을 보여 식물의 생리적 상태를 정량적으로 해석하는데 이용될 수 있을 것으로 보인다. 특히, Fm값은 겨울철에 낮아져 초겨울과 늦은 겨울에 각각 68%, 30%로 크게 감소하였다. 이는 겨울철에 엽면적 당(CS) 광계 II 안테나에 산화상태의 엽록소분자들이 적어서 나타나는 결과라고 할 수 있는데 Fig. 2의 항산화효소 활성 및 발현양상에서 보는 바와 같이 겨울철 저온에 의해 문주란 잎이 스트레스를 받고 있음을 의미한다고 할 수 있다. 광계 II 형광수율(flux ratios 또는 yields)을 의미하는 변수들 중에 Φ_{PO} 와 활력도(vitality index)를 나타내는 변수들 중에 $\Phi_{PO}/(1-\Phi_{PO})$ 는 겨울철 저온에 노출되는 기간이 길어짐에 따라 각각 50%와 17%로 감소하였다. 이는 겨울철 저온에 의해 광계 II의 반응중심이 손상을 입거나 스트레스 조건에 처해 있음을 나타내며, 늦은 겨울에 큰 폭으로 감소한 것은 시간이 경과함에 따라 식물체에 가해지는 스트레스가 누적된 결과로 해석할 수 있다. 그리고 반응중심 당 광계 II 활성(fluxes activities/RC)을 의미하는 변수들 중에 ABS/RC는 초겨울보다는 늦은 겨울에 2배 정도 증가하였는데, 이는 엽면적 당 반응중심이 대부분 불활성화되어 있는 결과로 보인다.

적 요

본 연구는 환경요인의 변화, 특히 겨울철 저온이 식물체에 미치는 영향을 정량적으로 밝히기 위해, 저온감수성 식물인 문주란을 대상으로 겨울철 일주기에 있어서 항산화효소 활성과 O-J-I-P 곡선의 변화를 조사하였다. 겨울철의 superoxide dismutase와 peroxidase의 활성은 여름철에 비해 다소 증가하였다. 특히, peroxidase는 겨울철 새벽과 밤에 높은 활성을 보였으며 초겨울에만 특이적으로 검출되는 isoenzyme들로 관찰할 수 있었다. 또한 겨울철 문주란 잎의 O-J-I-P 곡선에서 J, I, P-단계의 형광세기가 여름철에 비해 현저하게 감소하였다. 그리고, O-J-I-P 곡선으로부터 산출된 주요 형광변수들 중에 Fm과 Φ_{PO} 는 겨울철 저온에 노출되는 기간이 길어짐에 따라 각각 30%와 50%로 감소하였으며, ABS/RC는 초겨울보다는 늦은 겨울에 2배 정도 증가하였다.

사 사

본 연구는 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 수행되었음(KRF-2001-043-E0002).

참 고 문 헌

- 오순자, 고석찬. 2004a. 겨울철 자연환경에 노출된 문주란 잎의 엽록소형광과 항산화효소 활성에 관한 연구. *환경생물*. 22:233-241.
- 오순자, 고석찬. 2004b. 겨울철 저온스트레스에 의한 문주란의 광합성효율과 *psbA* 유전자의 발현양상. *한국환경과학회지*. 13:359-365.
- 오순자, 고정근, 김응식, 오문유, 고석찬. 1999. 두릅나무과 식물의 SOD활성과 광계 II의 광화학적 효율에 미치는 온도스트레스와 paraquat의 영향. *환경생물*. 17:199-204.
- Allen DJ and DR Ort. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci*. 6:36-42.
- Beauchamp C and I Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem*. 44:276-287.
- 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.
- Hetherington SE, J He and RM Smillie. 1989. Photoinhibition at low temperature in chilling-sensitive and resistant plants. *Plant Physiol*. 90:1609-1615.
- 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.
- 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.
- 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.
- Öquist G, DH Greer and E Gren. 1987. Light stress at low temperature. pp.67-87. In *photoinhibition* (Kyle DJ, CB Osmond and CJ Arntzen eds.), Elsevier, Amsterdam.
- Powles SB. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 35:15-44.
- 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.
- Rintamäki E, R Salo, E Lehtonen and EM Aro. 1995. Rapid turnover of the D1 reaction-center protein of photosystem II as a protection mechanism against photoinhibition in a moss, *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. *Planta* 193:520-529.
- Srivastava A, B Guissé, H Greppin and RJ Strasser. 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in PS II 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. 5*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Woodbury W, AK Spencer and MA Sthamann. 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzyme. *Anal. Biochem*. 44:301-305.

Manuscript Received: March 17, 2005

Revision Accepted: April 30, 2005

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