

배수성이 다른 자생 버뮤다그래스의 휴면 전후 항산화 효소활성 및 세포막 안정성 변화

이금주^{1,*} · 이혜정² · 마기윤¹ · 전영주¹ · 김인경¹
¹목포대학교 원예과학과, 전남 무안군 청계면 무안로 560
²충북대학교 식물자원학과, 충북 청주시 흥덕구 성봉로 410

Antioxidant Enzyme Activity and Cell Membrane Stability of Korean Bermudagrass Genotypes Different in Ploidy at Dormant Stage

Geung-Joo Lee^{1,*}, Hye-Jung Lee², Ki-Yoon Ma¹, Young-Ju Jeon¹, and In-Kyung Kim¹

¹Dept. of Horticulture, Mokpo National Univ., Jeonnam 534-729
²Dept. of Crop Science, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763

ABSTRACT. Korean bermudagrass collections showed diverse genetic variations in their morphology, growth habit, and cytological aspects. Chromosome number and nuclear DNA content of the bermudagrasses indicated a ploidy level ranging from triploid (2n=3x) to hexaploid (2n=6x). In this study, we investigated the different responses of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase) and cell membrane stability of those bermudagrass cytotypes to lower temperature and shorter day length, which meets a dormant induction in Korea. All the antioxidant enzymes were found to be higher during dormant stage, while the heme-containing catalase which converts hydrogen peroxide (H₂O₂) to water and oxygen molecules was activated before dormant initiation in the three cytotypes except for hexaploid bermudagrass. The triploid and tetraploid which exhibited relatively finer leaves and a rapid establishment speed were found to show increased activities of superoxide dismutase and peroxidase enzyme. The malondialdehyde(MDA) which is a product of lipid peroxidation in the cell membrane damaged by the hydroxyl radical was increased in all cytotypes as temperature declined, and tri- and tetraploids which had more protective antioxidant enzymes demonstrated a significantly lower MDA production. Similarly electrolyte leakage was higher in penta- and hexaploidy, seemingly more damage to cell membrane when low temperature was implemented. Results indicated that antioxidant responses of different cytotypes were genetically specific, which needs to be investigated the relevance with the low temperature tolerance in the bermudagrass further at the molecular level.

Key words: Bermudagrass cytotype, Electrolyte leakage, Low temperature stress, Malondialdehyde, Reactive oxygen species

서 론

잔디의 이용 및 적용지역이 확대됨에 따라 최근 환경 스트레스(건조, 염도, 고온, 저온, 부적합 토양환경, 생물학적 인자 등)에 대한 내성을 가진 새로운 특성의 난지형 잔디 품종 요구도가 증가하고 있다. 잔디를 최적의 관리기법을 도입하여 건강하게 유지하는데 방법에 비하여 내성을 가진 잔디를 이용하면 수요자 중심의 다양한 잔디 종

또는 품종을 공급할 수 있고, 스트레스 극복을 위한 관리 비용을 낮출 수 있으며, 다양한 관리기술을 유연성 있게 적용할 수 있다는 측면에서 환경스트레스에 자주 노출될 수 있는 잔디 재배지역에서 유망한 전략이 될 수 있다고 하겠다. 따라서 이러한 환경 스트레스에 대한 내성 또는 저항성과 관련된 기작(mechanisms)을 명확히 이해할 수 있다면 내성을 가진 잔디 유전자원을 선발하고, 새로운 품종으로 개발하는데 실질적인 실마리를 제공할 수 있다. 이제까지 환경 내성에 대한 작물학적 농업 특성을 기초로 한 비교 연구는 많이 되어 있지만 생화학적인 실마리를 통한 접근은 상대적으로 미흡했다(Trenholm et al., 2000; Lee et al., 2005).

*Corresponding author: Tel: +82-61-450-2371
E-mail : gjlee@mokpo.ac.kr
Received : May 9, 2011, Revised : May 19, 2011, Accepted : May 30, 2011

활성 산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)은 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 노출되었을 때 많은 식물체의 살아있는 세포에서 다량으로 생산되고 스트레스의 크기에 비례적으로 증가한다고 알려졌다(Moller et al., 2007). Buffalograss (*Buchloe dactyloides*)는 chinch bug 곤충의 공격으로부터 저항성이 강한 개체와 약한 개체간에 catalase (CAT)의 수준이 다르게 나타났고, peroxidase (POX)의 함량은 저항성 개체에서 크게 증가하였다(Heng-Moss et al., 2004). Bermudagrass (*Cynodon dactylon*)가 동해(freezing stress)에 노출되게 되면 superoxide dismutase (SOD)는 초기에 증가하다가 이 후에 감소하는 경향을 보이나 항산화효소 catalase와 ascorbate peroxidase (APX)의 함량은 품종에 관계없이 그 함량수준이 감소한다고 보고하고 있다(Zhang et al., 2006). 따라서 내성을 가진 잔디 유전자원의 선발을 위해 항산화효소의 함량 변화와 활성의 차이를 조사하여 변화양상을 정량화한다면 새로운 품종의 개발에 유용한 생화학적 지표가 될 수 있을 것이다.

세포막을 구성하는 불포화 지방산(예, 18:2 linoleic acid, 18:3 linolenic acid)은 특히 산화과정에서 발생하는 1O_2 (singlet oxygen)이나 HO^{\cdot} (hydroxyl radical)의 피해를 특히 심하게 받는 세포내 구조물로 지방 과산화수소물질들(lipid hydroperoxides)을 생성하게 되어 세포막의 유동성을 감소시키고 세포 내부로부터의 전해질 유출(electrolyte leakage)을 촉진시켜 2차적인 세포막 단백질의 피해를 가져오게 한다(Moller et al., 2007). 난지형 잔디의 하나인 seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*)의 경우 냉해 유발 온도(낮과 밤의 온도가 각각 8°C와 4°C)로 처리했을 때 포화지방산(palmitic acid와 stearic acid)의 함량은 변화가 없었지만, 세엽이며 저온 저항성이 큰 PI 509018-1 ('SeaIsle 1') 품종의 경우 불포화지방산 linolenic acid의 함량이 크게 증가하였고 지방산 구성의 변화가 전해질 유출의 방지를 도와 잔디의 저온 저항성을 증가시킨다고 설명하고 있다(Cyril et al., 2002).

기존 연구를 통해 한국 자생 버뮤다그래스는 형태 및 생리생육 면에서 매우 다양한 생태형이 존재한다는 것이 밝혀졌다(Kang et al., 2009). 또한 이들 자생 수집종간의 핵형 분석 결과 3배체(2n=3x), 4배체(2n=4x), 5배체(2n=5x) 및 6배체(2n=6x)가 염색체 수를 각각 27, 36, 45 그리고 54개 가지고 있음이 밝혀졌다.

본 연구는 배수성이 다른 국내 자생 버뮤다그래스 대표 종간에 내한성 차이를 알아보기 위하여 저온시기에 유도된 휴면 상태에서 항산화효소의 변화와 세포막의 물리적 안정성을 조사해봄으로써 저온에 대한 반응성을 정량화하기 위하여 실시되었다. 본 연구결과는 향후에 국내에서 적용할 수 있는 내한성 버뮤다그래스 잔디의 개발을 위한

기초로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

항산화효소 분석

항산화 효소의 추출 및 측정은 다음과 같이 실시하였다. 9월 15일 및 휴면에 돌입한 10월 20일경에 채취한 국내 자생 버뮤다그래스 잔디 잎 0.5 g을 액체질소에 넣고 마쇄하여 분말 상태의 시료를 만든 후 2% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone을 포함한 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 5 ml와 함께 혼합하여 추출하였다.

Superoxide dismutase (SOD)의 활성은 NBT 환원법을 사용하여 측정하였다(Beyer와 Fridovich, 1987). 활성 측정을 위한 반응물은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) (13 mM methionine, 60 μ M nitroblue tetrazolum (NBT), 그리고 0.025% Triton X-100 구성)에 0.4 μ M riboflavin 및 단백질 추출액으로 구성되었다. 반응물이 들어있는 시험관을 광 상태에서 7분간 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 활성은 NBT 환원 저해율로 계산하였다.

Catalase (CAT)의 활성은 Aebi (1974)의 방법을 수정하여 측정하였다. 조효소액 0.05 ml를 10 mM H_2O_2 를 포함한 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 0.95 ml와 혼합하고, 240 nm의 흡광도에서 1분간 H_2O_2 의 분해 정도를 측정하였다.

Peroxidase (POD)의 활성은 반응물에 과산화수소를 첨가하여 측정하였다(Pütter, 1974). 반응물은 7.8 mM H_2O_2 가 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), 15 mM pyrogallol (7.8 mM H_2O_2 , 15 mM pyrogallol)가 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) 및 단백질 추출물을 혼합하여 25°C에서 1분간 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 290 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ascorbate Peroxidase (APX)의 활성은 Mittler et al. (1993)의 방법에 의해 290 nm에서 흡광도의 감소 정도를 이용해 측정하였다. 반응물은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mM ascorbate, 1 mM H_2O_2 , 0.1 mM EDTA 및 단백질 추출액으로 구성하였다. 효소 활성은 분당 290 nm에서 변화되는 흡광도를 측정하여 계산하였다.

세포막의 지질과산화 정량분석

세포막의 지질과산화 정도는 지질과산화를 통해 생성되는 malondialdehyde (MDA)를 측정하여 간접적으로 조사하였다. 실험 방법은 Dhindsa (1981)의 방법을 수정하여 사용하였다. 0.5 g의 식물 조직을 0.1% trichloroacetic acid (TCA) 5 mL을 첨가하여 마쇄한 뒤 10,000 \times g에서 10분간

원심 분리하여 상등액 1 ml을 20% TCA, 0.5% thiobarbituric acid (TBA) 4 ml과 혼합한 뒤 95°C에서 30분간 중탕하고 빠르게 냉각시킨 후 10,000 ×g로 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상등액을 취해 535 nm에서 흡광도를 측정하여 600 nm의 비 특정 흡광도를 제거한 뒤 계산하였다. Extinction coefficient는 535 nm에서 155 mM⁻¹cm⁻¹을 사용하여 TBA reactive species (TBARS)을 생체중 g당 함량으로 계산하였다.

Bermudagrass electrolyte leakage

Bermudagrass 3, 4, 5, 6 배체의 휴면 전과 휴면 후 세포막 손실에 의한 전해질 유출 정도의 차이를 보기 위해 9월 중순과 11월 중순 경에 잎, 줄기, 뿌리를 채취하여 electrolyte leakage를 측정 하였다. Bermudagrass 3, 4, 5, 6 배체를 비슷한 두께의 잎, 줄기, 뿌리를 선별하여 각각 길이 0.5~1 cm로 자른 후 증류수 10 ml를 넣은 conical tube에 잎 0.3 g, 줄기 0.5 g, 뿌리 0.3 g을 혼합하였다. 각 샘플은 잎, 줄기, 뿌리 별로 3반복하여 실험하였다. 시료용액이 든 튜브를 shaking incubator (120 rpm, 25°C)에 넣고 18시간 동안 방치한 후 꺼내어 EC meter로 측정하였다(EC1).

측정한 샘플 튜브를 -80°C 초저온냉동고에 3시간 이상 동결시켰다. 동결시킨 시료용액은 상온상태 에서 1~2시간 녹인 후 다시 shaking incubator (120 rpm, 25°C)에 넣어 12시간 동안 방치 후 꺼내어 EC meter로 측정하였다(EC2). EC1/EC2값으로 저온처리에 따른 이온유출 정도를 표시하였다.

결과 및 고찰

저온 등 환경 스트레스에 대한 식물의 내성 증가는 생존을 위해 필요하다. 배수성이 다른 국내 자생 버뮤다그래스 대표 종간 내한성 차이를 알아보기 위하여 저온시기에 유도된 휴면 상태에서 항산화효소의 활성 변화와 세포막의 물리적 안정성을 조사하였다.

휴면기와 같은 저온 조건은 광화학계를 손상시켜 엽록체에 과도한 양의 여기에너지가 생성되며, 여기된 에너지는 엽록체 내에 풍부한 산소분자에 전달되어 초산소이온(O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂), 일중항산소(¹O₂)와 히드록시 라디칼(·OH)과 같은 활성산소종(ROS)을 생성한다. 활성산소는 원형질막과 엽록체를 비롯한 세포 내 여러 소기관들을 과산화시키고 세포를 파괴하는 유해한 작용을 하는데, 특히 생체막의 주요 성분인 불포화 지질은 활성산소종의 공격에 취약하며, 과산화되면 malondialdehyde (MDA)와 같은 과산화지질을 생성하고 전해질 누출이 증가되는 과산화적 증상이 나타나게 된다.

항산화 효소들은 공통적으로 저온 등 환경스트레스에 식물이 노출되었을 때에 광합성이나 호흡 등 대사과정에서 과대하게 생성되는 활성산소종(ROS)을 선택적으로 소거함으로써 다른 대사 호르몬의 정상적인 역할이나 세포막의 물리적 체계를 보호함으로써 세포의 기능을 유지시켜 준다고 알려져 있다(Moller et al., 2007). Superoxide anion을 H₂O₂로 변환시켜 유해산소에 대한 보호기능을 하는 Superoxide Dismutase (SOD)와 SOD에 의해 생성된 H₂O₂를

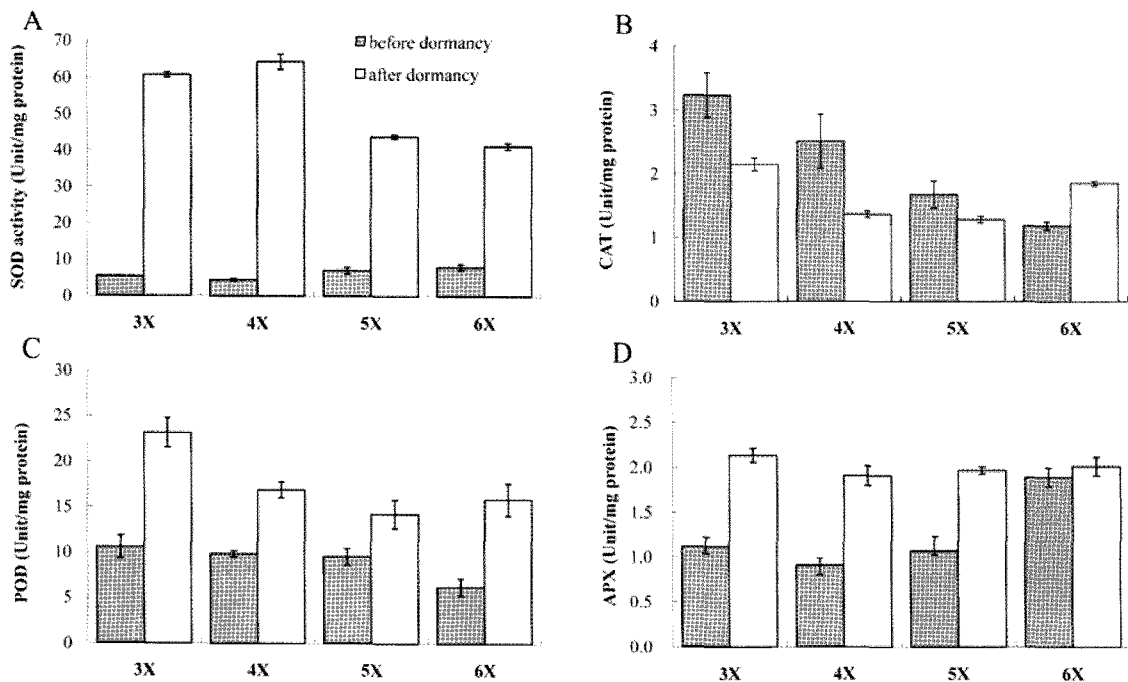


Fig. 1. The activities of antioxidant enzyme of bermudagrasses in different polyploidy level before and after dormancy (A~D).

기질로 이용하여 O_2 와 H_2O 로 대사시키는 대표적인 효소들 즉, Catalase (CAT), Ascorbate Peroxidase (APX), Peroxidase (POD)의 반응을 조사하였다.

실험 결과 항산화 효소의 반응은 배수성이 다른 개체별로 큰 차이를 보이고 있었다. SOD는 휴면 전에는 모든 배수체에서 큰 차이를 보이지 않으나 휴면 시기에는 3배체와 4배체에서 매우 높게 나타났다. CAT는 모든 생태종에서 휴면 시기보다는 생육 중에 활성이 더 높았으나, APX와 POD의 활성은 휴면 시기에 더 높았다. 저온, 단일 환경 조건에서는 일반적으로 생육속도가 빠르고 상대적으로 세엽인 3배체 및 4배체 자생 버뮤다그래스 생태종들은 휴면기에 Superoxide Dismutase와 Peroxidase항산화 효소의 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

수분 결핍, 염, 저온 스트레스 등과 같은 환경적 스트레스는 활성산소의 증가를 가져오며, 그 결과 세포막의 안정성이 파괴되어 MDA 및 전해질 누출의 증가와 같은 과산화적 증상이 나타나게 된다. 이와 같이 버뮤다그래스 생태종들의 저온 환경에 대한 세포막의 안정성을 확인하기 위해 MDA 함량과 전해질 유출(electrolyte leakage)을 조사하였다. 그 결과 지질의 분해 산물인 MDA 함량은 휴면 전에는 모든 생태종에서 유사하게 나타났으나 온도가 감소함에 따라 더 많은 양의 항산화효소를 갖고 있는 3배체와 4배체에서는 MDA 산물이 현저하게 낮게 나타났다(Fig. 2). 또한 전해질 유출(electrolyte leakage)은 예상한 대로 휴면 후에 모든 조직에서 전해질 유출량이 증가하였고 특히 5배체와 6배체의 잎 조직에서 전해질 유출량은 3배체와 4배체에 비하여 매우 크게 증가했음을 알 수 있었다(Fig. 3). 즉 저온이 적용될 때 세포막이 크게 영향을 받는 것으로 추정된다.

이 결과 국내 자생 버뮤다그래스에서 그 배수성의 차이가 유전적으로 생육, 잔디의 품질 및 내한성 차이와 연관

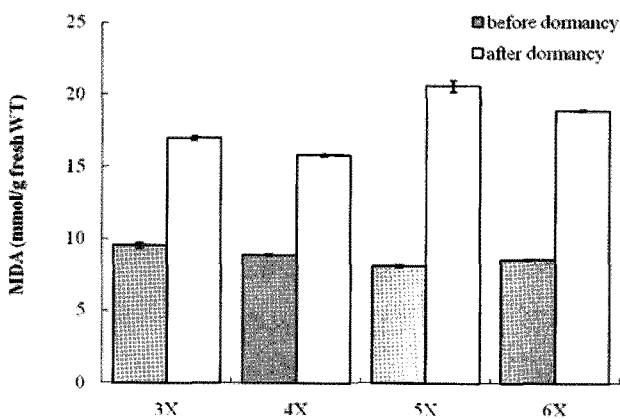


Fig. 2. The malondialdehyde (MDA) contents of bermudagrasses in different polyploidy level before and after dormancy.

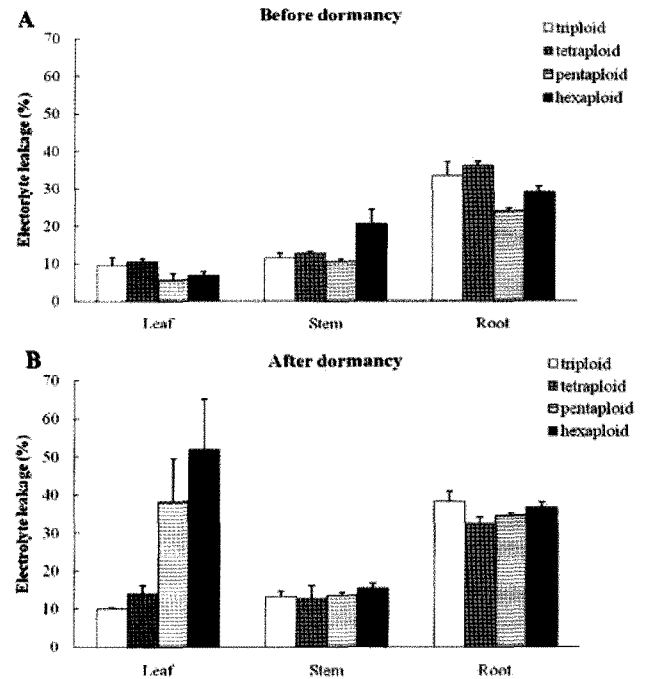


Fig. 3. The electrolyte leakage from leaf, stem, and root of bermudagrasses in different polyploidy level (A) before and (B) after dormancy.

성이 있는 것으로 추정되었고, 이것은 품질이 우수한 내한성 버뮤다그래스 잔디 개발 가능성을 시사해주는 결과라 하겠다.

요 약

기존 보고된 바에 의하면 한국 자생 버뮤다그래스는 군집 내에서 형태학, 생육 특성, 세포학적 특성에 대해 유전적으로 매우 다양한 변이를 보여주었다. 버뮤다그래스의 염색체 수와 핵 DNA 량에 따르면 배수성 수준의 범위가 3배체($(2n=3x)$), 4배체($(2n=4x)$), 5배체($(2n=5x)$), 6배체($(2n=6x)$)로 나타났다. 본 연구에서는 한국에서 휴면이 유도되는 저온과 짧은 일장에 대한 항산화효소(superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase)의 다양한 반응과 각 버뮤다그래스 세포형의 세포막 안정성을 조사하였다. 모든 항산화효소는 휴면 기간동안 높게 나타났으나, 과산화수소를 물과 산소 분자로 변환시키는 헵기를 함유한 카탈라제는 6배체 버뮤다그래스를 제외한 세 개의 세포형에서 휴면이 개시되기 전에 활성화되었다. 상대적으로 세엽이며 생육속도가 빠른 3배체와 4배체는 superoxide dismutase와 peroxidase 효소의 활성이 증가됨을 확인하였다. 수산기를 가진 라디칼에 의해 손상을 받은 세포막에서 지질 과산화의 산물인 말론디알데히드(MDA)는 온도가 감소함에 따라 모든 세포형에서 증가되었고, 방어적인 항산화효

소를 더 갖고 있는 3배체와 4배체는 MDA 생산이 현저하게 더 낮게 나타났다. 전해질 유출은 5배체와 6배체에서 더 높았던 것과 유사하게, 저온이 적용될 때 의견상으로 세포막에 더 손상을 받는 것 같았다. 실험 결과, 서로 다른 세포형(cyotype)의 항산화 반응은 유전적으로 특이적이며, 이는 버뮤다그래스에서 저온 저항성과의 연관성을 분자 수준에서 더 연구하는 것이 필요하다.

주요어: 버뮤다그래스 cyotype, 전해질유출, malondialdehyde, 저온 스트레스, 활성산소종

감사의 글

본 연구는 목포대학교 신진교수 연구지원 사업의 일부와 산림청 산림과학 기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

- Aebi, H. 1974. Catalase. p. 673-684. In: H.U. Bergmeyer (ed.). *Methods of enzymatic analysis*, vol. 2, Academic Press, N.Y.
- Beyer, W.F. and I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161:559-566.
- Cyril, J., G.L. Powell, R.R. Duncan, and W.V. Baird. 2002. Changes in membrane polar lipid fatty acids of seashore paspalum in response to low temperature exposure. *Crop Sci.* 42:2031-2037.
- Dhindsa, R.S. and W. Matowe. 1981. Drought tolerance in two mosses correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* 32:79-91.
- Heng-Moss, T., G. Sarath, F. Baxendale, D. Novak, S. Bose, X. Ni, and S. Quisenberry. 2004. Characterization of oxidative enzyme changes in buffalograsses challenged by *Blissus Oxidius*. *J. Econ. Entomol.* 97:1086-1095.
- Kang, S.Y., G.J. Lee, K.B. Lim, H.J. Lee, I.S. Park, S.J. Chung, J.B. Kim, D.S. Kim, and H.K. Rhee. 2008. Genetic diversity among Korean bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes characterized by morphological, cytological and molecular approaches. *Mol. Cells* 25:163-171.
- Lee, G.J., R. N. Carrow, and R.R. Duncan. 2005. Growth and water relation responses to salinity stress in halophytic seashore paspalum ecotypes. *Sci. Hortic.* 104:221-236.
- Lee, H.J. G.J. Lee, D.S. Kim, J.B. Kim, J.H. Ju, and S.Y. Kang. 2008. Selection and physiological characterization of glyphosate-tolerant zoysiagrass mutants derived from a gamma ray irradiation. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26:454-463.
- Mittler, R. and B.A. Zilinskas. 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of ascorbate dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem.* 112:540-546.
- Moller, I.M., P.E. Jensen, and A. Hansson. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:459-481.
- Ptter, J. 1974. Peroxidase. p. 685-690. In: Bergmeyer, H.U.(ed.). *Methods of enzymatic analysis*, vol. 2, Academic Press, N.Y.
- Trenholm, L.E., M.J. Schlossberg, G. Lee, and W. Parks. 2000. An evaluation of multi-spectral responses on selected turfgrass species. *Int. J. Remote Sensing* 21:709-721.