

박사학위논문

아열대성 식물 문주란(*Crinum asiaticum* var.
japonicum)에서 저온 스트레스에 의한
항산화효소 활성 및 엽록소형광 변화에 관한 연구

Studies on the Changes in Antioxidative Enzyme Activities and
Chlorophyll Fluorescence Parameters in a Subtropical Plant, *Crinum*
asiaticum var. *japonicum* under Low Temperature Stress



제주대학교 대학원

생물학과

오 순 자

2002년 12월

아열대성 식물 문주란(*Crinum asiaticum* var.
japonicum)에서 저온 스트레스에 의한
항산화효소 활성 및 엽록소형광 변화에 관한 연구

Studies on the Changes in Antioxidative Enzyme Activities and
Chlorophyll Fluorescence Parameters in a Subtropical Plant, *Crinum*
asiaticum var. *japonicum* under Low Temperature Stress

지도교수 고 석 찬

오 순 자

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함



오순자의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 : _____ (인)

위 원 : _____ (인)

제주대학교 대학원
2002년 12월

Studies on the Changes in Antioxidative Enzyme Activities and
Chlorophyll Fluorescence Parameters in a Subtropical Plant, *Crinum
asiaticum* var. *japonicum* under Low Temperature Stress

Soonja Oh

(Supervised by Professor Seok Chan Koh)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF
PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

December, 2002

목 차

Abbreviations and terms -----	i
List of tables -----	iv
List of figures -----	v
Summary -----	viii
I. 서 론 -----	1
1. 연구배경 -----	1
2. 제주지역의 자연환경 -----	5
3. 연구목적 -----	7
II. 아열대성 식물 4종의 향산화효소와 엽록소형광의 변화 ----	9
1. 서 론 -----	9
2. 재료 및 방법 -----	11
3. 결과 및 고찰 -----	17
4. 요약 -----	40
III. 문주란 향산화효소 활성과 엽록소형광의 계절적 변화 ----	42
1. 서 론 -----	42
2. 재료 및 방법 -----	44
3. 결과 및 고찰 -----	46
4. 요약 -----	57
IV. 문주란의 향산화효소 활성과 엽록소형광의 겨울철 일주기적 변화 -----	58
1. 서 론 -----	58
2. 재료 및 방법 -----	60

3. 결과 및 고찰 -----	65
4. 요약 -----	82
V. 종합고찰 -----	84
VI. 요약 -----	89
VII. 참고문헌 -----	91
Appendix -----	103

Abbreviations and Terms

Abbreviations

APX	Ascorbate peroxidase
BSA	Bovine serum albumin
Chl	Chlorophyll
CS	Cross section of the sample leaf
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DIG	Digoxigenin
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
NBT	Nitro blue tetrazolium
PCR	Polymerase chain reaction
PEA	Plant efficiency analyzer
PI	Performance index
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PQ	Plastoquinone
PS II	Photosystem II
PVP	Polyvinyl-pyrrolidone
RC	Reaction center
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFI	Structural function index
SOD	Superoxide dismutase
SSC	Saline sodium citrate
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA

Terms

ABS	Energy fluxes of photons absorbed by the antenna pigments
D1 protein	PSII reaction center protein that is the product of the <i>psbA</i> gene
D1o	Energy dissipation
ETo	Energy fluxes of electron to transport chain
Fm	Chlorophyll fluorescence yield associated with complete of closure PSII centers in the dark-adapted state, equal to Fp
Fm'	Maximum yield of chlorophyll fluorescence in the light-adapted state
Fo	Chlorophyll fluorescence yield with all PSII centers open in the dark-adapted state
Fp	Peak chlorophyll fluorescence
Fv	Variable chlorophyll fluorescence in the dark-adapted state, equal to Fm-Fo
Fv/Fm	Potential quantum yield of PSII photochemistry in the dark-adapted state (the ratio of variable and maximal chlorophyll fluorescence)
I-step	Step at 60 ms of Chl a fluorescence rise between O and P steps
J-step	Step at 2 ms of Chl a fluorescence rise between O and P steps
Mo	Slope at the beginning of the transient Fo→Fm, maximal fractional rate of photochemistry, equal to (dv/dt) _o
O-step	Step at 50 μs of Chl a fluorescence rise
P-step	Step at 300 ms of Chl a fluorescence rise
<i>psbA</i> gene	Gene coding for D1 protein
Q _A	Primary electron accepting plastoquinone of PSII

Q_B	Secondary electron accepting plastoquinone of PS II
q_N	Non-photochemical quenching of fluorescence
q_P	Photochemical quenching of fluorescence
TR_o	Energy fluxes of excitons channeled to the reaction center
V_t	Relative variable fluorescence at time t
Φ_{EO}	Probability of a absorbed exciton moving an electron beyond Q_a^-
Φ_{PO}	Maximum quantum yield of primary photochemistry
Ψ_o	Efficiency with which a trapped exciton can move an electron into the electron transport chain



List of Tables

Table 2-1. Seasonal changes of experimental expressions at the JIP-test derived from the fluorescence transients O-J-I-P presented in Fig. 2-6.

Table 2-2. Seasonal changes of different structural and functional parameters provided by the JIP-test, calculated from the data of Table 2-1 and the fluorescence transients O-J-I-P presented in Fig. 2-6.

Table 2-3. Relationships between environmental factors and chlorophyll fluorescence parameters of four subtropical plant species under natural field conditions in summer.

Table 2-4. Relationships between environmental factors and chlorophyll fluorescence parameters of four subtropical plant species under natural field conditions in winter.

Table 4-1. The values of experimental expressions of the JIP-test derived from the fluorescence transients O-J-I-P presented in Fig. 4-5.

Table 4-2. The values of the different structural and functional parameters provided by the JIP-test, calculated from the data of Table 4-1 and the fluorescence transients O-J-I-P presented in Fig. 4-5.

List of Figures

Figure 1-1. Highly simplified model presenting schematically the specific energy fluxes in PSII (According to Strasser and Strasser, 1995).

Figure 1-2. Seasonal changes of temperature, relative humidity of air, and precipitation determined from January, 1999 to February, 2002 in the Jeju meteorological station.

Figure 2-1. The light-adaptation transient of a dark-adapted leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*.

Figure 2-2. Isoenzyme profiles of superoxide dismutase from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (A), *Osmanthus insularis* (B), and *Asplenium antiquum* (C) at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter.

Figure 2-3. Isoenzyme profiles of catalase from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (A), *Osmanthus insularis* (B), and *Asplenium antiquum* (C) at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter.

Figure 2-4. Isoenzyme profiles of peroxidase from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (A), *Osmanthus insularis* (B), *Chloranthus glaber* (C) and *Asplenium antiquum* (D) at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter.

Figure 2-5. Isoenzyme profiles of ascorbate peroxidase from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (A), and *Asplenium antiquum* (B) at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter.

Figure 2-6. Seasonal changes of chlorophyll a fluorescence transients O-J-I-P of PSII from leaves of 4 tropical/subtropical plant species at dawn (06:00) in summer or winter.

Figure 2-7. The fluorescence transients recorded in leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*, *Osmanthus insularis*, *Chloranthus glaber* and *Asplenium antiquum* under the natural conditions in summer (A) and winter (B). The presented transients were measured at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00).

Figure 2-8. Diurnal variation of environmental factors (temperature, light density, and relative humidity) and chlorophyll fluorescence parameters (F_o , F_m , F_v/F_m , $1-q_N$ and $1-q_P$) from leaves of 4 tropical/subtropical plant species in summer.

Figure 2-9. Diurnal variation of environmental factors (temperature, light density, and relative humidity) and chlorophyll fluorescence parameters (F_o , F_m , F_v/F_m , $1-q_N$ and $1-q_P$) from leaves of 4 tropical/subtropical plant species in winter.

Figure 3-1. Seasonal variations of temperature, relative humidity of air, and precipitation determined from July, 2001 to February, 2002 in the Sungsanpo meteorological station near natural habitat of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* during this investigation period. The arrows indicate the days of fluorescence measurements.

Figure 3-2. SOD isoenzyme profiles from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*, at dawn (06:00) in summer (S) and winter (W).

Figure 3-3. Isoenzyme profiles of catalase (A), peroxidase (B) and ascorbate peroxidase (C) from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*, at dawn (06:00) in summer (S) and winter (W).

Figure 3-4. Seasonal variations of fluorescence transients O-J-I-P and spider plots of selected parameters quantifying the behaviour of PSII from leaves of 4 tropical/subtropical plant species.

Figure 3-5. Seasonal variations of chlorophyll fluorescence parameters (F_o , F_m , F_v/F_m , $1-qN$ and $1-qP$) from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*.

Figure 4-1. Diurnal variation of temperature, light density, and relative humidity, and on the natural habitat of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* in summer and winter.

Figure 4-2. 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.

Figure 4-3. Diurnal variation of chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_m , $1-qN$, $1-qP$) from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* on the natural habitat in winter.

Figure 4-4. Immunoblot of D1 protein of PSII and RNA gel blot of psbA and 16S rRNA genes from *Crinum asiaticum* var. *japonicum* leaves, at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter.

Figure 4-5. Diurnal changes of fluorescence transients O-J-I-P from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* on the natural habitat in summer and winter.

Summary

Seasonal and diurnal changes of antioxidative enzymes, chlorophyll fluorescence and O-J-I-P transients were investigated using leaves of four subtropical plant species (*Crinum asiaticum* var. *japonicum*, *Osmanthus insularis*, *Chloranthus glaber* and *Asplenium antiquum*) in the natural conditions, in order to screen the indicators for the estimation of environmental stresses and to apply them in monitoring of plant physiological states such as vitality, productivity, sensitivity and resistance to stresses, etc.

The activities of antioxidative enzymes and their isoenzyme patterns were changed seasonally and diurnally in the leaves of the four species, and the changes were specific to each plant species or to the environmental conditions. Particularly, peroxidase was ubiquitous with various isoenzymes to all species in environmental conditions. In the O-J-I-P transients of these species, the fluorescence intensity were found to be higher in O-step and lower in P-step in winter than in summer. Particularly in *Crinum* plants, the P-step was lower than those of other three species, indicating that this *Crinum* species is the most sensitive to low temperature. In winter, the values of Fm and Fv/Fo decreased in leaves of four species with the increase of Sm and N, and the photochemical efficiencies of PSII, Fv/Fm, of leaves of these plants were significantly low in winter, contrary to its high value in summer. Furthermore, conspicuous diurnal fluctuations of Fv/Fm were not found in winter. These results indicated that these subtropical plant species were affected by seasonal drop of temperature. This could be also confirmed by the dramatic decrease of Fv/Fm and changes of activities and isoenzyme pattern of antioxidative enzymes in winter.

In the leaves of *Crinum* plants, the most sensitive species to low

temperature among the four species, J, I, P-step lowered dramatically depending on temperature drop in winter. The values of F_m , F_v/F_o , F_v/F_m , ABS/CS , TR_o/CS , RC/CS , ϕ_{PO} and $\phi_{po}/(1-\phi_{po})$ decreased gradually with the increase of S_m , N and ABS/RC . The F_v/F_m value of leaves of crinum plants were significantly low in late winter without diurnal fluctuations, whereas it was high in the summer. However, the values of $1-q_N$ and $1-q_P$ were lower in day time (12:00) than at dawn (06:00) and night (20:00), and D1 protein was less expressed at mid-day in winter. In day time of winter were found the increase of ET_o/RC , ET_o/CS and $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ and the decrease of RC/CS .

Of chlorophyll fluorescence parameters in leaves of four subtropical plant species, F_m , F_v/F_o and F_v/F_m decreased with the increase of S_m and N in winter, and ET_o/RC , ET_o/CS and $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ increased with the decrease of RC/CS in day time of winter. This suggests that these fluorescence parameters could be used as the indicators for sensing of low temperature stress, which occurred seasonally and/or diurnally.

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

I. 서 론

1. 연구배경

식물은 환경요인의 계절적 변화에 따라 여러 가지 생리적 변화를 겪으면서 성장한다 (Polle *et al.*, 2001). 하지만, 예기치 못한 환경요인의 변화는 식물체에 손상을 가하고 경우에 따라서는 고사를 유발하기도 한다 (Dormling, 1982). 스트레스에 대한 식물의 반응은 내성과 감수성으로 구분할 수 있으며, 환경변화에 내성이 강한 식물은 유전적인 조절 또는 세포 대사 작용의 변화를 통하여 주변 환경의 변화에 순응할 수 있으나, 환경 변화에 민감한 식물은 그렇지 못하다 (Karimzadeh *et al.*, 2000). 따라서, 환경 변화에 대한 영향을 객관적으로 판단할 수 있는 기준을 마련하여 식물의 반응을 정량하고 식물의 생산성을 예측하는 것은 중요한 일이라고 할 수 있다. 더군다나, 최근에는 환경오염, 자외선량의 증가, 지구온난화, 산성비 등에 의해 식물의 생육환경조건이 변화하고 있는데 그에 따른 식물체의 반응 및 변화를 예측하기 위한 수단이 필요하다. 환경스트레스에 대한 식물의 상태는 외부형태상의 피해, 항산화기구의 발현, 특이적인 단백질이나 유전자 수준에서의 조절, 광합성능의 변화 등을 분석함으로써 파악할 수 있다 (Mckersie and Leshem, 1994). 식물의 성장이나 외부형태상의 피해는 생육장애, 병징, 세포 내용물의 변형 또는 파괴 등을 조사하므로써 판정할 수 있으나, 가시적으로 증상이 나타나지 않는 경우에는 그 영향을 평가하기가 쉽지 않아서 식물의 생리·생화학적 반응을 토대로 평가하여야 한다. 그 중 비교적 객관적으로 그 영향을 제시할 수 있는 방법이 항산화기구의 발현이나 엽록소형광의 변화 등을 분석하는 것이다.

1.1. 항산화기구

식물을 포함한 호기성 생물체가 고온, 저온, 건조, 오존, 고광 등의 환경스트레스를 받으면 생체내 산소 (O_2)가 전자와 반응하여 superoxide anion

radical (SAR, $\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$), singlet oxygen (1O_2) 등 반응성이 높은 독성의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 변한다 (Alscher and Hess, 1993). 이들은 강한 산화력을 가지고 있어 세포막 분해, 지질 산화, 단백질 분해, DNA 합성 저해, 광합성 억제, 엽록소 파괴, 노화촉진 등 심각한 생리적 장애를 일으키며, 심한 경우 세포사멸을 초래한다 (Alscher and Hess, 1993; Asada, 1999). 그러나, 식물은 활성산소종에 의한 산화적 스트레스로부터 자신을 보호하기 위한 방어기작으로서 일련의 항산화시스템을 구축하여 환경에 적응한다 (Lidon and Henniques, 1993). 생체내 항산화기구는 각각의 스트레스원에 대한 개별의 신호전달체계를 갖추어 근본적으로 활성산소종의 발생을 억제하거나 발생된 활성산소종을 제거함으로써 산화적 손상을 방지할 수 있다. 생체내에서 활성산소제거시스템에 관여하는 물질로서는 superoxide dismutase (SOD), peroxidase, catalase 등의 항산화효소와 ascorbic acid, α -tocopherol, β -carotene, glutathione 등의 항산화물질이 있다 (Alscher and Hess, 1993; Inze and Van Montagu, 1995). 따라서 환경스트레스에 의한 활성산소종의 생성 여부, 또는 그에 대한 방어기작으로 항산화물질이나 항산화효소의 발현 여부를 분석함으로써 식물의 생리적 상태를 진단할 수 있다. 그러나, 항산화기작의 발현과 같은 생리·생화학적 조사방법은 식물조직을 파괴하여야 하고 분석방법 또한 간단하지 않다.

1.2. 엽록소형광

환경스트레스에 대한 식물의 반응을 정확하고 간편하게 측정할 수 있는 방법으로는 엽록소형광 분석 (chlorophyll fluorescence analysis), 엽록소형광 이미지 분석 (chlorophyll fluorescence image analysis), 잎의 반사율 이미지 분석 (reflectance image analysis), 그리고 열이미지 분석 (thermal image analysis) 등이 있으며, 이들 분석 방법을 통해 환경스트레스에 의한 광합성효율, 구조적인 변화, 수분상태의 변화 등을 정밀하게 분석할 수 있다 (Nilsson, 1995; Peuelas and Filella, 1998; Lichtenthaler and Mieh, 1997). 특히, 엽록소형광 분석법은 다양한 환경스트레스가 식물 잎의 광합성

기구에 미치는 영향을 쉽고 빠르게 분석할 수 있다.

광합성의 일차반응과 엽록소a 형광의 관계에 대해서는 Kautsky와 Hirsh (1931)가 처음으로 보고하였으며, 이후 엽록소형광은 다양한 화학물질이나 환경조건 등 스트레스가 식물 잎의 생리적 상태에 미치는 영향을 연구하는데 이용되고 있다. Fig. 1-1은 광계II에서의 에너지전이 과정과 엽록소형광분석 이론을 단순화하여 도식화한 것이다 (Strasser and Strasser, 1995). 암적응된 잎에 빛을 비추면 광계II의 안테나 엽록소 분자 (안테나 색소, antenna pigment)들은 빛에너지 (ABS/RC)를 흡수하여 여기상태의 엽록소 분자 (Chl^*)로 변화되며, 흡수된 에너지 중 일부 에너지 (TR_0/RC)는 광계II의 반응중심으로 이동하여 Q_A 를 환원시키고, 나머지 에너지 (F)는 형광, 인광, 또는 열의 형태로 방출하게 된다. 그리고, 광계II의 반응중심으로 이동된 에너지 중 일부 (ET_0/RC)는 산화환원 전위의 기울기에 따라 플라스트퀴논 (plastoquinone; PQ)으로 이동하여 광합성반응을 수행하게 된다. 이러한 에너지전이는 O-J-I-P (polyphasic rise of Chl a fluorescence transients) 곡선으로 분석해낼 수 있으며 크게 3단계로 구분할 수 있다 (Barthélemy *et al.*, 1997). 먼저 O ($50\mu\text{s}$)와 J (2ms)로 연결되는 O-J구간은 광계II의 반응중심에서 초기 전자수용체인 Q_A 의 광화학적 환원, 즉 $\text{Q}_A^- \text{Q}_B$ 의 축적을 의미하며, J (2ms)와 I (60ms)로 연결되는 J-I구간은 광계II의 반응중심에서 $\text{Q}_A^- \text{Q}_B^-$ 의 축적을 반영하는 것으로 광계II의 donor 부분 (water splitting activity)에 의해 조절되며 형광소멸이 관찰된다. 마지막으로 I (60ms)와 P (300ms)로 연결되는 I-P구간에서는 광계II의 반응중심에서 plastoquinone pool (PQ pool)로의 전자전달활성, 즉 $\text{Q}_A^- \text{Q}_B^{2-}$ 의 축적을 의미하며 형광소멸이 관찰된다 (Stirbet *et al.*, 1998). 이러한 O-J-I-P 곡선으로부터 F_0 , F_m , F_v/F_m 등의 변수를 산출할 수 있다 (Appendix I). F_0 는 광계II의 일차 quinone수용체인 plastoquinone A (Q_A)가 완전히 산화상태에 있을때의 형광으로 여기된 에너지가 광계II의 반응중심으로 이동하기 전 광계II 안테나의 여기된 엽록소 분자들이 방출하는 것이다. F_m 는 Q_A 가 완전히 환원된 상태의 형광이며 F_p 와 동일한 의미로 사용된다. 이로부터 F_v/F_m , 즉 $1-F_0/F_m$ 을 산출할 수 있는데, F_v/F_m 은 여기된 에너지가 광계II 안테나에

의해 수확된 후 광계 II 반응중심으로 전달되어 광화학반응에 이용되는 효율을 의미한다 (Kitajima and Butler, 1975).

이러한 형광반응은 광계 II의 반응중심과 공여체, 수용체의 산화-환원 상

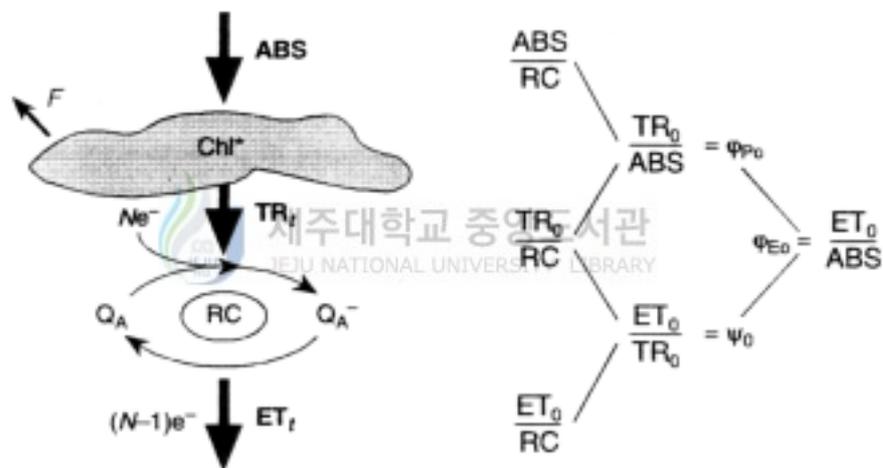


Figure 1-1. Highly simplified model presenting schematically the specific energy fluxes in PSII (According to Strasser and Strasser, 1995). ABS, fluxes of photons absorbed by the antenna pigments; Chl*, excited pigment; TR_t, fluxes of excitons channeled to the reaction center (RC) at time t; ET_t, fluxes of electrons to transport chain; F, fluorescence emission. The equations express the yields ϕ_{PO} , ϕ_{EO} , and ψ_0 derived from the fluxes at time zero.

태에 영향을 받으며, proton translocation, thylakoid stacking과 unstacking, ionic strength, cyt b-559 중심의 potential 등에 의해 영향을 받는다. 그러므로 엽록소형광의 변화는 광합성의 변화를 반영한다고 할 수 있다. 그리고, 광량 (Tsimilli-Michael *et al.*, 1996; Srivastava and Strasser, 1996, 1997; Krüger *et al.*, 1997), 온도 (Srivastava *et al.*, 1999; Strasser, 1997), 건조 (Van Rensburg *et al.*, 1996), 화학적 영향 (Ouzounidou *et al.*, 1997)과 같은 환경스트레스 하에서 O-J-I-P 곡선의 변화는 뚜렷하게 나타난다. 따라서 여러 가지 환경스트레스에 의한 식물의 O-J-I-P 곡선 분석과 이로부터 산출된 형광변수들을 이용하여 환경스트레스에 대한 식물의 생리적 반응이나 내성 등을 연구하는 데도 활용하여 광합성 기구의 구조 및 기능의 변화를 정량적으로 제시할 수 있다.

2. 제주지역의 자연환경

온도는 광량, 강우량과 더불어 식물의 성장과 발달, 지리적 분포와 생존 등에 결정적으로 작용하는 요인 중 하나이다 (Berry and Björkman, 1980). 식물체는 성장과 발달에 필요한 특정한 온도 범위 즉, 최적온도를 가지며, 이 온도를 중심으로 고온과 저온의 극단적인 온도에 대한 상한과 하한 온도를 갖는다. 온도가 양쪽 한계에 가까워질수록 생장이 감소하고, 그 한계를 넘어서면 고사하게 된다 (Kratsch and Wise, 2000). 그리고 열대 및 아열대성 식물들은 저온에 특히 민감하게 반응하여 10℃ 미만의 온도에 노출되면 호흡, 광합성 및 단백질 합성의 감소, 단백질 합성의 양상의 변화를 포함한 대사작용에 이상현상이 유발되며 수시간 또는 수일 내에 식물체에 심각한 파괴

또는 사멸을 초래하게 되는데 이는 저온이 가해졌을 때 발생하는 활성산소가 주된 역할을 하는 것으로 알려졌다 (Hodhes *et al.*, 1997).

최근 3년간의 제주지역 기상자료를 분석해 보면 (Fig. 1-2), 기온은 연평균 15.7~16.1°C, 상대습도는 평균 65.0~71.0%, 강우량은 평균 3.3~6.9mm이며 연도별 경향성이 거의 같았다. 기온은 1~2월에 월평균 6.1°C로 낮았고, 10°C

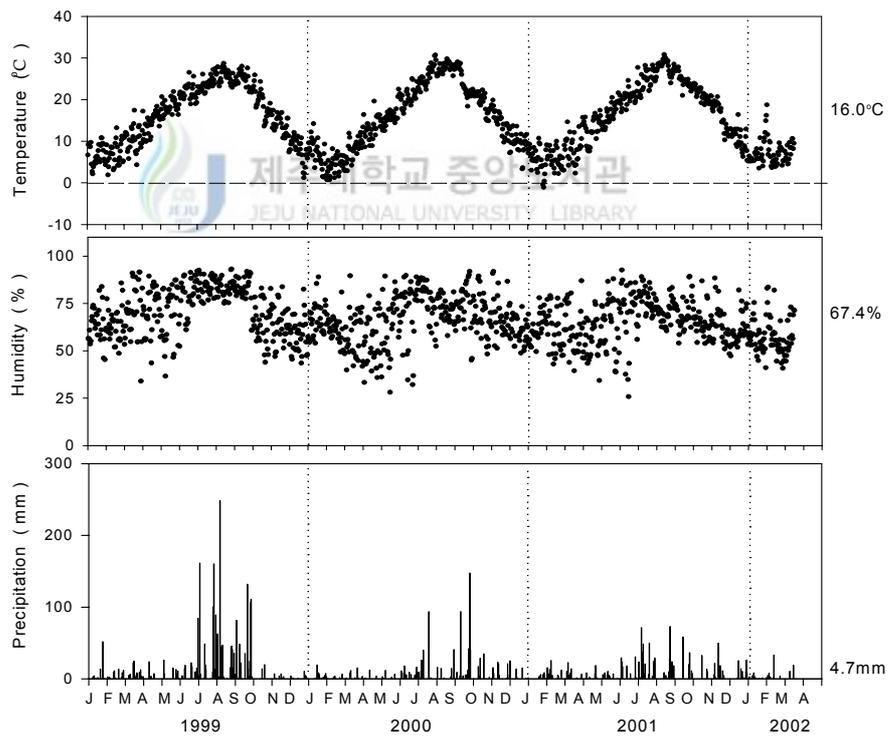


Figure 1-2. Seasonal changes of temperature, relative humidity of air, and precipitation determined from January, 1999 to February, 2002 in the

Jeju meteorological station.

이하인 기간이 4개월 (12월, 1~3월)이나 되었으며, 8월이 26.8℃로 가장 높았다. 연 최저기온도 1~2월이 평균 3.4℃ 이하로 낮았고, 연 최고기온은 8월이 평균 29.6℃로 높게 나타났다. 상대습도는 계절에 관계없이 대부분이 60% 이상을 유지하였으며, 특히 여름철 (7~8월)에 월평균 75% 이상의 높은 상대습도를 유지하였다. 따라서, 제주지역의 겨울철 (12월, 1~2월) 저온은 열대 또는 아열대성 식물의 생육에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

3. 연구목적

제주도에는 열대 또는 아열대 기원의 식물들이 다수 분포하고 있다. 식물 지리학적으로 제주도가 분포상 북방한계선인 식물로는 파초일엽 (*Asplenium antiquum*), 문주란 (*Crinum asiaticum* var. *japonicum*), 녹나무 (*Cinnamomum camphora*), 담팔수 (*Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*), 한란 (*Cymbidium kanran*), 솔잎난 (*Psilotum nudum*), 죽절초 (*Chloranthus glaber*), 만년콩 (*Euchresta japonica*), 갯대추 (*Paliurus ramosissimus*), 황근 (*Hibiscus hamabo*), 박달목서 (*Osmanthus insularis*), 무주나무 (*Lasianthus japonicus*) 등이 잘 알려진 종들이다. 이들 식물들은 온도, 특히 최적조건 이하의 저온에 민감하게 반응하기 때문에 광합성능의 분석을 통해 환경스트레스에 대한 식물의 반응을 정량하기 위한

좋은 재료가 될 것으로 보인다. 특히, 문주란은 열대 및 아열대 지역에서는 상록성을 유지하지만 제주도에서는 겨울철 저온에 의해 지상부가 고사하기 때문에 자연조건 하에서 일어나는 저온 스트레스에 따른 반응을 연구하기에 좋은 재료라고 할 수 있다.

따라서, 본 연구는 환경요인의 변화, 특히 겨울철 저온에 의한 아열대성 식물의 반응기구를 규명하고 환경스트레스에 대한 식물의 생리적 상태를 진단할 수 있는 지표를 제시하고자, 1) 문주란 (*C. asiaticum* var. *japonicum*), 박달목서 (*O. insularis*), 죽절초 (*C. glaber*), 파초일엽 (*A. antiquum*)을 대상으로 수종의 항산화효소의 활성변화와 엽록소형광의 변화를 비교하여 저온에 대한 반응양상을 비교·분석하였다. 특히, 2) 저온에 민감한 문주란을 대상으로 항산화효소 활성, 엽록소형광, 그리고 D1 단백질과 psbA 유전자의 발현양상을 계절적·일주기적으로 조사·분석하였다.



II. 아열대성 식물 4종의 항산화효소와 엽록소형광의 변화

1. 서 론

식물은 환경요인의 계절적 변화에 따라 여러 가지 생리적 변화를 겪으면서 성장한다. 식물이 각종 환경스트레스를 받으면 생체내 산소 (O_2)는 반응성이 높은 독성의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 변하며 (Alscher and Hess, 1993), 이들은 강한 산화력을 가지고 있어 핵산, 단백질, 지질 등의 변성과 광합성 억제 등 심각한 생리적 장애를 일으키고, 결국 식물체를 고사하게 만든다 (Alscher and Hess, 1993; Asada, 1999). 그러나 식물체가 정상적으로 성장을 유지할 수 있는 것은 독성의 활성산소종을 중화시키는 기능을 갖고 있기 때문이다 (Lidon and Henniques, 1993). 활성산소에 대한 식물의 방어기작은 활성산소의 형성을 억제하거나 생성된 활성산소를 제거하는 것인데, SOD, peroxidase 등의 효소에 의한 방어 기작과 ascorbic acid 등의 항산화물질에 의한 방어기작으로 구분할 수 있다 (Alscher and Hess, 1993; Inze and Van Montagu, 1995). 그러나 이러한 식물의 반응은 스트레스의 강도나 기간 뿐만이 아니라 식물종에 따라서도 항산화효소 활성과 isoenzyme 패턴이 변한다는 점을 고려할 때, 환경스트레스에 대한 식물의 환경적응성 또는 생리적 상태를 확인하는데 사용할 수 있다.

그리고, 환경스트레스에 대한 식물의 생리적 상태를 진단하는 기준으로서 광합성능의 변화를 분석하여 제시할 수 있다. 특히, 엽록소형광 분석법은 다양한 환경스트레스가 식물 잎의 광합성 기구에 미치는 영향을 쉽고 빠르게 분석할 수 있으며, 여러 가지 환경스트레스에 대한 식물의 생리적 반응이나 내성 등을 연구하는데도 활용하여 광합성 기구의 구조 및 기능의 변화를 정량적으로 제시할 수 있다. 광계II는 광합성 기구 중에서 환경스트레스에 가장 민감하여 환경스트레스에 대한 지표로 이용되고 있으며, 광계II의 활성은 엽록소형광을 측정함으로써 빠르고 비파괴적으로 산출할 수 있다 (Ball *et al.*,

1994). 엽록소형광을 이용한 광계Ⅱ 활성의 연구로는 빛에 의한 억제 (Osmond, 1994), 일주기적·계절적 변화 (오 등, 2001), 식물 성장과의 관계 (Lovelock *et al.*, 1994), 군집 유동성과의 관계 (Kamaluddin and Grace, 1992) 등이 있으며, 환경요인 변화에 대한 중간 반응성의 차이, 여러 가지 환경스트레스에 대한 식물의 생리적 반응이나 내성 등을 연구하는데도 활용되고 있다.

Fig. 1-2의 제주기상대에서 관측한 제주지역의 기상자료를 살펴보면, 계절적으로는 겨울철 4개월 (12월, 1~3월)에 걸쳐 월평균온도가 10℃이하인 낮은 온도를 보이며, 겨울철 새벽과 밤 (야간)에 0℃ 이하의 온도를 나타내기도 하여 아열대성 식물의 생육에 영향을 미칠 것으로 보인다. 열대 및 아열대성 식물들은 저온에 대한 적응성이 약해서, 저온이 가해졌을 때 그에 적응하지 못하고 죽거나 심한 장애를 받게되는데, 이는 저온이 가해졌을 때 발생하는 활성산소가 주된 역할을 하는 것으로 알려졌으며 (Hodhes *et al.*, 1997), 광합성능력에도 영향을 미친다.

따라서 본 연구는 제주도에 자생하는 문주란, 박달목서, 죽절초, 파초일엽 등 아열대성 식물 4종을 대상으로 항산화효소 활성과 광합성 능력의 계절별, 그리고 일주기적 변화를 조사하였으며, 환경요인과의 연관성을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에서는 북제주군 구좌읍 하도리 토끼섬 (난도) 일대의 해변사구에 자생하고 있는 문주란 (*Crinum asiaticum var. japonicum*)과 제주도 수목시협소 내에 생육하고 있는 박달목서 (*Osmanthus insularis*), 죽절초 (*Chloranthus glaber*), 파초일엽 (*Asplenium antiquum*)을 사용하였다. 문주란은 동령의 식물체를 선정하여 외부로 노출되어 자연광을 받는 잎 중에서 엽색이 비슷하고 SPAD값이 50~60의 범위에 해당하는 균일한 상태의 잎을 실험재료로 사용하였다. 그리고 박달목서, 죽절초, 파초일엽은 엽색이 비슷하고 SPAD값이 각각 60~70, 40~50, 40~50의 범위에 해당하는 성숙한 잎을 실험재료로 사용하였다.

2. 환경요인 조사

환경요인으로는 엽록소형광 측정 당시의 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 반복으로 측정하였다.

3. 항산화효소 활성분석

3.1. 조효소액의 제조

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

0.1 mM EDTA 함유)을 사용하여 마쇄하였다.

3.2 전기영동

전기영동은 Laemmli (1970)의 방법을 변형하여 native gel 하에서 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 SOD와 APX는 10% polyacrylamide running gel을, catalase와 peroxidase는 7.5%의 polyacrylamide running gel을 사용하였으며, stacking gel은 3% polyacrylamide running gel을 사용하였다. 시료를 vertical slab gel에 loading하여 stacking gel에서는 50V, running gel에서는 100V로 전기영동하였다.

3.3. 효소의 선별염색

3.3.1. Superoxide dismutase

Superoxide dismutase (SOD)의 발현은 Beauchamp와 Fridovich (1971)의 방법을 변형한 riboflavin/nitro blue tetrazolium 방법을 사용하여 실시하였다 (오 등, 1999). 즉, 전기영동이 끝난 겔을 2.45 mM nitro blue tetrazolium (NBT) 용액에 넣어 20분간 어두운 곳에 둔 후, 암상태에서 15분간 반응용액 (36 mM potassium phosphate, pH 7.8; 28 mM TEMED, 28 μ M riboflavine)에 넣어 진탕하고, 빛을 조사하면서 5-10분간 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다. SOD isoenzyme 특성분석을 위해서는 전기영동이 끝난 겔을 3 mM H_2O_2 와 2 mM KCN 용액에 담가 30분간 진탕한 후 동일한 방법으로 SOD를 검출하여 조사하였다.

3.3.2. Catalase

Catalase의 검출은 Woodbury 등 (1971)의 ferricyanide염색법을 사용하여 실시하였다. 즉, 전기영동이 끝난 겔을 3.27 mM H_2O_2 가 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.

3.3.3. Peroxidase

Peroxidase의 검출은 Rao 등 (1996)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 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.

3.3.4. Ascorbate peroxidase

Ascorbate peroxidase (APX)는 Mittler와 Zilinskas (1993)의 방법을 사용하여 확인하였다. 즉, 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 암 상태에서 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다.

4. 엽록소형광의 측정 및 분석

4.1. O-J-I-P 분석

O-J-I-P (polyphasic rise of Chl a fluorescence transients) 패턴은 Strasser와 Strasser (1995)의 방법에 따라 Plant Efficiency Analyzer (PEA; Hansatech Instrument Ltd., UK)를 이용하여 측정하고 분석하였다. O-J-I-P 곡선은 매회 측정시 20 반복으로 측정하여 분석하였다. 측정을 위한 time scale은 10 μ s에서 1 s의 범위로 설정하였으며, 10 μ s에서 2 ms까지는 1 μ s 단위로 인식하게 하였으며, 2 ms에서 1 s까지는 1 ms 단위로 인식하도록 설정하였다. 초기유도곡선은 15분간 광을 차단하여 암적응시킨 후 1,500 μ mole/m²/sec의 광량을 1초간 조사하여 작성하였으며, 50 μ s (O-단

계), 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 9개의 기본적 형광변수(F_o , F_m , F_v/F_o , VJ , VI , $(dv/dt)_o$, Sm , N , Sm/T_{max})들을 제시하였다. 그리고 이를 토대로 다시 구조적 변수(structural parameters; RC/CS , Φ_{po} , Ψ_o , Φ_{eo})와 기능적 변수(functional parameters; ABS/RC , TR_o/RC , ET_o/RC , ABS/CS , TR_o/CS , ET_o/CS)들을 산출하여 제시하였으며, 이들의 계산식과 그 의미는 Appendix I에 제시하고 있다.

4.2. 엽록소형광 측정

엽록소형광은 15분간 광을 차단하여 암적응시킨 후 PEA를 이용하여 $1,500 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 광량을 1초 간 조사하고 F_v/F_m , F_o , F_m 등을 산출하였다. 비광화학적 형광소멸 (non-photochemical quenching; q_N)과 광화학적 형광소멸 (photochemical quenching; q_P)과 관련이 있는 $1-q_N$ 과 $1-q_P$ 은 Fig. 2-1의 light-adaptation transient를 토대로 하여 two strong light pulse로 측정하고 산출하였다 (Strasser *et al.*, 2000). Fig. 2-1A는 암적응된 문주란의 앞에 순간적인 $1,500 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 포화광을 비추어 광계II의 최대효율을 측정한 후 계속해서 $100 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 연속광을 비추면서 매 10초 간격으로 포화광을 비추어 조사한 light-adaptation transient를 나타낸 것이다. 연속광이 유지되고 있는 상태에서 포화광을 비추면 F_m 은 dF_m 보다 점차 낮아지고 F_o 는 dF_o 보다 높아진다. 하지만, 계속해서 연속광을 비추면 수분 후 정류상태에 도달하게 되어 lF_m 과 lF_o 를 얻을 수 있으며, 이들 dF_m , dF_o , lF_m , lF_o 를 이용하여 $1-q_N$, $1-q_P$ 를 산출할 수 있게 된다. 그러나, 연속광의 광량을 $150 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 으로 높이면 Fig. 2-1B와 같은 light-adaptation transient를 나타내어 보다 일찍 정류상태에 이르게 되어 신속하게 lF_m 과 lF_o 를 얻을 수 있게 된다. 이와 같은 문주란에서 얻은 결과를 토대로 본 연구에서는 Fig. 2-1B에서 제시된 포화광과 연속광을 사용하여 two strong light pulse로 lF_m 과 lF_o 를 측정하여 다음의 공식 1)과 2)를 이용하여 $1-q_N$ 과 $1-q_P$ 을 산출하였다 (Strasser *et al.*, 2000, Appendix I).

$$1-qN = ({}^1F_v/{}^1F_o)/({}^dF_v/{}^dF_o) \quad \text{-----} \quad (1)$$

$$1-qP = ({}^1F_s-{}^1F_o)/({}^1F_m-{}^1F_o) \quad \text{-----} \quad (2)$$

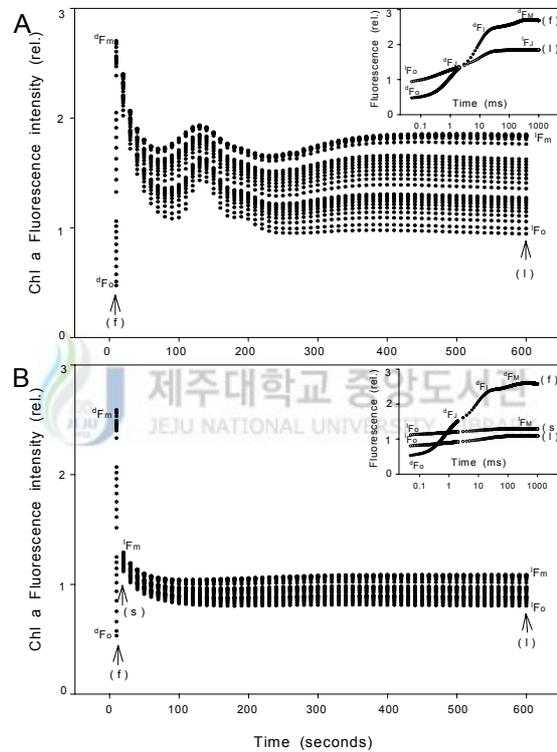


Figure 2-1. The light-adaptation transient of a dark-adapted leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*. The light-adaptation time was 10min and the actinic light intensity was 100 $\mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$ (A) or 150 $\mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$ (B), provided by the light source of the PEA instrument. Every 10sec during the actinic illumination, a light pulse of 1 sec with 1,500 $\mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$ was applied which provoked a fast fluorescence rise, measured and digitized between 10 μs to 1 s by the PEA instrument. The inset shows the fast fluorescence rise of the

first (f), second (s) and last (l) light pulses. Each vertical trace in the main figure corresponds to a complete fast fluorescence rise [F_0 (or F_s), F_J , F_I , F_M]. The two envelope lines of the main figures correspond to the fluorescence transients under actinic light of F_m and F_p , respectively. The latter reaches finally a stationary value labeled F_s .

4.3. 엽록소형광과 환경요인과의 상관관계 분석

엽록소형광 (F_v/F_m , $1-q_N$, $1-q_P$, F_0 , F_m 등의 변수)과 환경요인 (온도, 광량, 상대습도)과의 상관관계는 여름철과 겨울철에 측정한 일변화 결과를 가지고 SPSS 통계 package (SPSS Inc., Release 7.5, 1996)를 이용하여 분석하였다.



3. 결과 및 고찰

1. 항산화효소 활성

제주도에 자생하는 문주란, 박달목서, 죽절초, 파초일엽 등 아열대성 식물 4종을 대상으로 여름철과 겨울철 일변화에 있어서의 SOD, peroxidase, catalase, APX의 isoenzyme 패턴을 전기영동으로 알아보았다 (Figs. 2-2~2-5).

SOD isoenzyme 패턴을 전기영동으로 살펴보면 (Fig. 2-2), 문주란, 박달목서, 파초일엽 3종은 계절에 따라 그 활성과 isoenzyme 패턴에 있어서 다소의 차이가 있으나 검출되었는데 반해 죽절초는 여름철과 겨울철에 관계 없이 SOD가 검출되지 않았다. 문주란 잎은 전체적으로 7개의 isoenzyme이 검출되었으며, 이들 isoenzyme은 1개의 Mn-SOD와 6개의 CuZn-SOD로 구분할 수 있었다. SOD는 함유하고 있는 금속의 종류에 따라 CuZn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD의 3종류로 나누어지는데 H₂O₂와 KCN에 의한 선택적 저해로부터 이를 구분할 수 있다 (Fridovich, 1974). 즉, SOD isoenzyme의 H₂O₂와 KCN에 의한 저해 정도를 조사한 결과, 문주란의 SOD 1은 H₂O₂와 KCN 어느 것에 의해서도 저해되지 않으므로 Mn-SOD로, 나머지 6개의 isoenzyme (SOD 2~SOD 7)은 H₂O₂와 KCN에 의해 모두 저해되어 CuZn-SOD로 추정할 수 있었다. 여름철과 겨울철에 있어서 뚜렷한 차이가 없을 뿐 아니라 일변화에 있어서도 큰 차이를 보이지 않았다. 박달목서 잎의 SOD isoenzyme은 5개의 CuZn-SOD로 구성되어 있으며, 여름철에는 활성을 거의 나타내지 않았으나 겨울철에는 높게 나타났다. 그리고 겨울철에는 새벽 (06:00)보다 낮 (12:00)과 밤 (20:00)에 높은 활성을 보였다. 파초일엽은 전체적으로 3개의 밴드가 관찰되었으며, 1개의 Mn-SOD와 2개의 CuZn-SOD로 구성되었다. 일변화에 있어서 여름철에는 낮시간에 다소 높았는데, 즉 2개의 CuZn-SOD 활성이 낮시간에 높았으며, 겨울철에는 새벽과 밤에 활성이 높았는데 특히 Mn-SOD 활성이 높게 나타났다. 활성산소종의 조절에 있어서 SOD는 산소분자로부터 한 개의 전자가 환원되어 생기는 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$)을 제거하는 작용 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$

+ O₂)을 하는 효소이며, 생체내에서 산화적 스트레스에 대한 방어작용을 하는 중심적인 역할을 수행한다 (Bowler *et al.*, 1992; Scandalias, 1993). 저온이

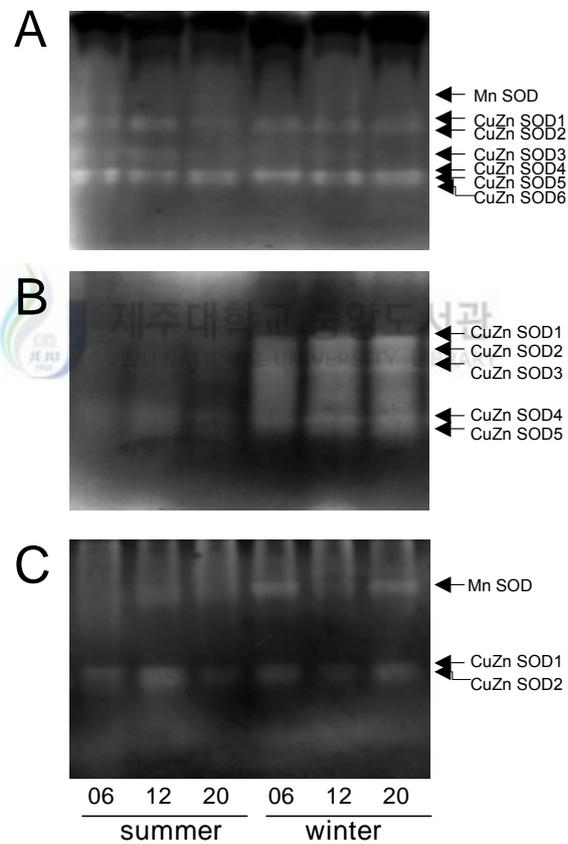


Figure 2-2. Isoenzyme profiles of superoxide dismutase from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (A), *Osmanthus insularis* (B), and *Asplenium antiquum* (C) at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night

(20:00) in summer and winter.

나 고온 등의 온도 스트레스, 강한 광선, 오존, 제초제, 수분 스트레스를 포함하는 일부 환경스트레스에 내성을 보이는 세포에서 SOD 활성은 뚜렷하게 증가하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 박달목서는 겨울철에 뚜렷하게 증가하는 양상을 보이고 있어 겨울철 환경 변화에 의한 영향을 받고 있음을 알 수 있으며, 다른 식물에 비해 겨울철 저온에 덜 민감한 것으로 보인다. 그리고 각각의 일변화에 있어서 여름철에는 낮시간에, 겨울철에는 새벽과 밤에 다소 높은 활성을 보였다. 이러한 결과는 저온감수성 식물인 오이를 4°C 저온에서 배양했을 때 SOD 활성이 증가하였으며 (Lee and Lee, 2000), 열대성 식물인 *Coleus blumei*을 10°C의 온도에서 배양하였을 때 SOD 활성이 증가하였다는 보고와 유사한 결과이다 (Peltzer *et al.*, 2002).

한편, SOD의 작용에 의해 O₂와 독성이 강한 hydrogen peroxide (H₂O₂)가 생성되며 (McCord and Fridovich, 1969), 생성된 H₂O₂는 catalase와 peroxidase에 의해 분해된다. 그리고 식물이나 광합성 조류의 경우 ascorbate peroxidase (APX)가 부가적으로 존재하며, 특히 이 효소는 광합성 기구인 엽록체에서 H₂O₂ 제거에 중요한 역할을 한다 (Asada, 1992; Tottempudi *et al.*, 1994). 따라서 SOD의 활성과 더불어 H₂O₂ 제거에 관여하는 catalase, peroxidase와 APX 활성을 살펴봄으로써 환경변화에 의한 식물의 생리적 상태를 짐작할 수 있다.

Catalase는 문주란, 박달목서, 파초일엽의 잎에서 단일밴드로 나타났으며, 죽절초에서는 검출되지 않았다 (Fig. 2-3). 그러나 그 발현 양상은 종에 따라 차이를 보였는데, 문주란 잎에서는 여름철이 겨울철에 비해 높은 활성을 보이는데 반해 박달목서와 파초일엽은 겨울철에 높은 활성을 보였다. 그리고 각각의 일변화에 있어서 문주란의 catalase 활성은 여름철에는 큰 차이를 보이지

않았으나, 겨울철에는 새벽과 밤에 낮은 활성을 보였다. 박달목서와 파초일엽도 여름철에 낮은 활성을 보였으나 일변화적 차이는 없었다. 하지만 겨울철에 박달목서는 낮시간에 다소 높은 활성을 나타내어 문주란과 유사한 양상을 보였으나, 파초일엽은 오히려 새벽과 밤에 높은 활성을 보였다. **Catalase** 활성은 저온감수성 식물이라고 하더라도 저온이나 다른 환경 인자에 대한 민감도의 차이를 보이며, 식물의 발달단계나 처리조건, 그리고 기간에 따라서도 달라지는 것으로 보인다 (El-saht, 1998; Feierabend *et al.*, 1992).

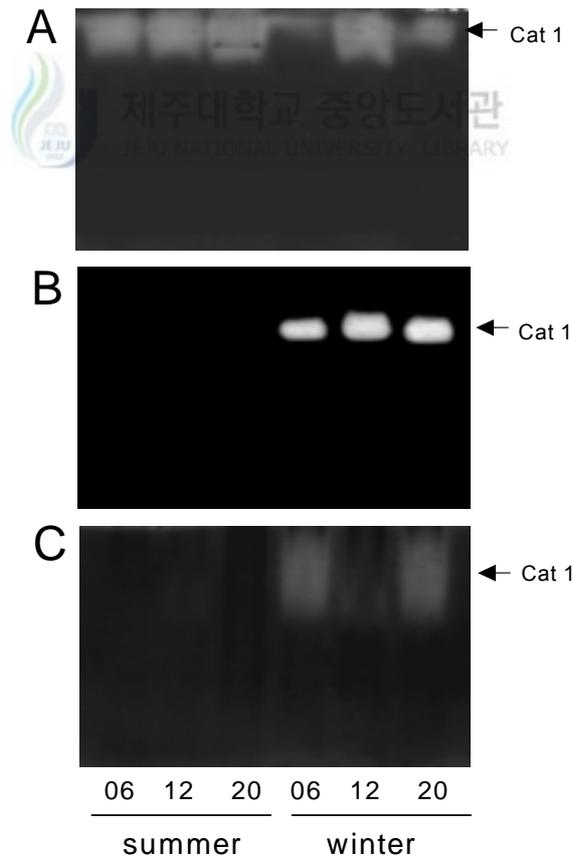


Figure 2-3. Isoenzyme profiles of catalase from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (A), *Osmanthus insularis* (B), and *Asplenium antiquum* (C) at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter.

Peroxidase isoenzyme 패턴을 전기영동으로 살펴보면 (Fig. 2-4), 종에 따라 isoenzyme 패턴과 그 활성에 차이가 있으나 4종 모두에서 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 문주란 잎은 전체적으로 4개의 밴드가 검출되었다. 이 중 peroxidase 1은 효소활성에는 차이가 있지만 여름철과 겨울철에 모두 검출되었으며, 3개의 isoenzyme (peroxidase 2~4)은 겨울철에만 특이적으로 검출되는 것으로 나타났다. 그리고 여름철에는 낮시간에 다소 높은 활성을 보였으며, 겨울철에는 낮시간보다는 새벽과 밤에 높은 활성을 보였다. 박달목서 잎은 전체적으로 5개의 밴드가 검출되었으며, 문주란 잎에서 관찰된 것과 같이 여름철보다는 겨울철에 높은 활성을 보였다. 여름철에는 낮시간에 다소 높은 활성을 보였고, 겨울철에는 새벽과 밤에 높은 활성을 보였으며, peroxidase 4와 peroxidase 5는 겨울철에만 특이적으로 나타났다. 죽절초 잎의 peroxidase는 단일 밴드로 검출되었으며, 여름철과 겨울철 모두 새벽과 밤에 활성을 보였는데, 겨울철에는 밤에 다소 높은 활성을 보였다. 그리고 파초일엽의 peroxidase isoenzyme 양상은 문주란이나 박달목서와 유사하게 여름철보다는 겨울철에 높은 활성을 보였고, 전체적으로 3개의 밴드가 검출되었다. 그리고 여름철과 겨울철의 일변화적 특성을 살펴보면, 여름철에는 낮시간에 다소 높은 활성을 보였고, 겨울철에는 낮시간에 다소 높았으나 일변화에 있어서 큰 차이를 보이지는 않았다. 이상의 결과를 살펴보면, 문주란, 박달목서, 파초일엽은 여름철보다는 겨울철에 높은 활성을 보였으며 겨울철에만 특이적으로 나타나는 isoenzyme들도 관찰할 수 있었다. 일변화적 특성에 있어서는 문주란과 박달목서는 낮시간에 활성이 낮아지고, 파초일엽은 반대로 낮

시간에 높은 활성을 나타내었다. 그리고, 죽절초는 여름철과 겨울철 낮시간에 peroxidase 활성이 발현되지 않았다. 강낭콩 (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) 유묘에 있어서 저온의 처리는 발달단계에 따라 다소의 차이는 있지만, 10°C 저온 처리에 의해 peroxidase 활성과 그 기질인 ascorbate 함량이 증가하였다 (El-saht, 1998). 그리고 아열대성 식물인 ixora (*Ixora coccinea* cv. 'Big Red')에서도 저온 스트레스에 의해 peroxidase 활성이 증가하였다는 보고가 있어 (Michaeli *et al.*, 2001), 본 연구에서의 결과와 유사하였다. 그리고 peroxidase isoenzyme 패턴은 세포의 발달과정, 노화, 환경조건의 변화 등에 따라서 변화하기 때문에

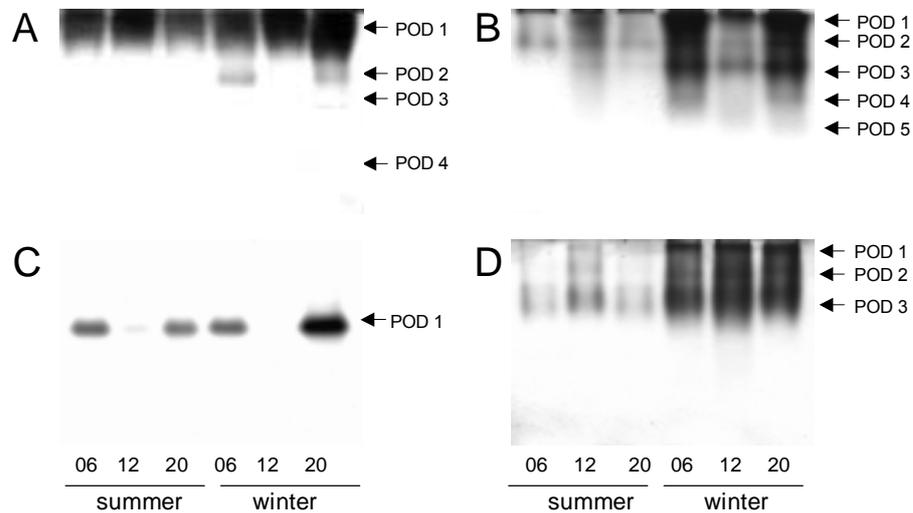


Figure 2-4. Isoenzyme profiles of peroxidase from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (A), *Osmanthus insularis* (B), *Chloranthus glaber* (C) and *Asplenium antiquum* (D) at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter.

peroxidase isoenzyme 패턴 변화를 스트레스의 지표 및 환경 오염에 대한 지표로 사용하려는 연구가 진행되고 있다 (Castillo, 1992; 이 등, 2000). 본 연구에서도 계절별 peroxidase isoenzyme 양상과 활성은 뚜렷한 차이를 보이며, 겨울철에 특이적으로 검출되는 isoenzyme들도 관찰할 수 있었다.

APX 패턴을 전기영동으로 살펴보면 (Fig. 2-5), 박달목서와 죽절초는 APX가 검출되지 않았으며, 문주란과 파초일엽은 각각 8개의 밴드와 5개의 밴드가 발현되었다. 문주란 잎의 APX isoenzyme은 여름철에 일변화적 특성은 나타내지 않았으나, 겨울철에는 새벽과 밤에 다소 높은 활성을 보였다. 그리고 파초일엽의 APX isoenzyme은 여름철에는 낮시간에, 겨울철에는 새벽과 밤에 다소 높은 활성을 보였다.

아열대성 식물 4종을 대상으로 SOD, catalase, peroxidase, APX isoenzyme의 계절별, 그리고 일변화적 패턴을 살펴본 결과, 종에 따라 차이를 보였으며, 양지에 자라는 문주란과 박달목서는 전체적으로 유사한 양상을 보였고, 파초일엽은 계절별 변화양상은 문주란, 박달목서와 유사하나 겨울철 일주기적 변화양상은 반대로 나타났다. 죽절초는 앞서의 3종의 식물과는 다른 양상을 보여 스트레스에 대한 식물의 적응기구가 다른 것으로 사료된다. 이들 항산화효소들은 각종 스트레스에 의해 과다하게 생성되는 활성산소종을

제거하는 기능을 가지고 있으며, 저분자 항산화제와 마찬가지로 스트레스 하에서 식물의 생존 또는 내성과 관련이 있다 (Foyer *et al.*, 1991). 그리고 SOD, APX는 각종 스트레스에 의해 유도되거나 또는 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Walker and McKersie, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Hodges *et al.*, 1997). 항산화효소의 패턴을 종합해보았을 때, peroxidase의 활성과 isoenzyme 패턴이 식물종이나 환경조건에 따라 가장 다양하게 나타났으며, 4종 모두에서 여름철보다 겨울철에 활성이 높았다. 더우기 문주란, 박달목서, 파초일엽에서는 겨울철에 특이적으로 검출되는 isoenzyme들도 관찰할 수 있었다. SOD와 catalase는 문주란, 박달목서, 파초일엽에서 검출되었으며, 특히 박달목서에서는 겨울철에 SOD 활성이 높았다. 그리고 catalase는 문주란 앞에서는 겨울철에 비해 여름철에 다소 높은 활성을 보였으며, 박달목서와 파초일엽에서는 겨울철에 높은 활성을 나타내었다. 그리고 문주란과 박달목서에서는 겨울철에 새벽이나 밤보다 낮시



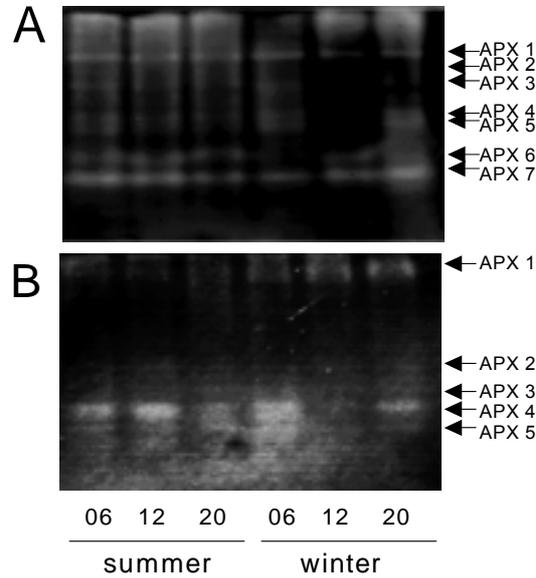


Figure 2-5. Isoenzyme profiles of ascorbate peroxidase from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (A), and *Asplenium antiquum* (B) at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter.

간에 높은 활성을 보였는데 파초일엽에서는 낮시간의 catalase 활성이 낮았다. APX는 문주란과 파초일엽에서 관찰되었으나 계절적으로 큰 차이가 없었으며, 겨울철에는 isoenzyme 패턴의 일주기적 변화가 관찰되었다. 이러한 결

과는 오이를 4°C의 저온에서 배양했을 때 SOD, peroxidase, APX 활성이 증가하였다는 보고와 유사하였다 (Lee and Lee, 2000). 그러나 이들 항산화 효소의 활성이 여름철에 비해 겨울철에 높은 활성을 보인다고 하더라도 증가된 활성산소를 효율적으로 소거할 수 없다면 광합성 기구는 물론 세포전반에 영향을 미쳐 질병유발, 노화 및 세포사멸 등 심각한 손상을 가할 수 있을 것이다. 특히, 광합성 기구에 미치는 영향은 광계II의 광화학적 효율을 의미하는 Fv/Fm의 변화로 예측할 수 있다.

2. 엽록소형광 분석

2.1. O-J-I-P 곡선의 변화

문주란을 포함한 4종의 아열대성 식물을 대상으로 여름철과 겨울철 새벽 (06:00)의 O-J-I-P 곡선의 패턴을 비교해보면 (Fig. 2-6), 종에 따라 다소의 차이는 있으나 4종 모두 겨울철에 O-단계에서의 형광세기는 증가하고, P-단계에서의 형광세기는 감소하였다. 이러한 결과는 4종 모두 겨울철 저온에 의해 광계II 반응중심의 전자수용체 quinone이 환원상태에 있음을 의미하며, 이는 광계II의 광합성효율, 즉 Fv/Fm의 감소를 야기하는 결과이다. 특히 P-단계의 감소는 문주란에서 현저하게 나타나 다른 3종 보다 겨울철 저온 스트레스에 민감한 것으로 보인다. 여름철 O-J-I-P 곡선의 패턴을 보면, 죽절초와 파초일엽은 문주란과 박달목서와는 달리 I-단계가 명확하지 않으며, P-단계에서의 형광세기는 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 대조적으로 겨울철에는 문주란과 박달목서에서 J-단계에서의 형광이 지속되지만, J-I구간, I-P구간이 명확하지 않았다. 그리고, 죽절초와 파초일엽은 여름철에 비해 P-단계에서의 형광세기가 다소 낮아졌지만 J-단계와 P-단계가 명확하며 파초일엽에서의 J-단계는 여름철에 비해 다소 높았다.

O-J-I-P 곡선으로부터 주요 변수들을 산출하였다 (Table 2-1). 그 결과, 종에 따라 다소의 차이는 있으나 4종 모두에서 겨울철에 Fo의 증가와 Fm과

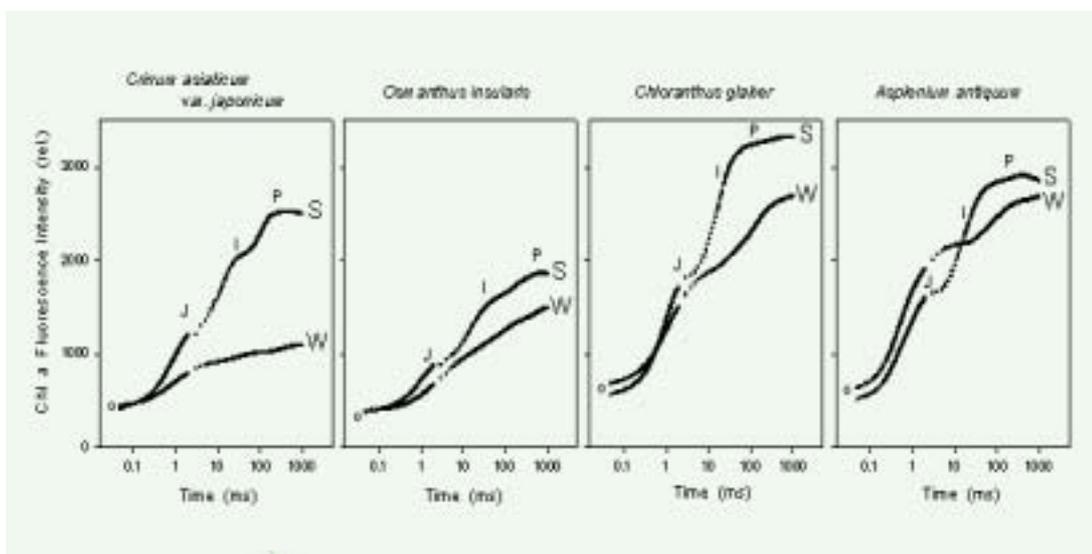


Figure 2-6. Seasonal changes of chlorophyll a fluorescence transients O-J-I-P of PSII from leaves of 4 tropical/subtropical plant species at dawn (06:00) in summer or winter.

Table 2-1. Seasonal changes of experimental expressions at the JIP-test derived from the fluorescence transients O-J-I-P presented in Fig. 2-6.

Parameters	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>japonicum</i>		<i>Osmanthus insularis</i>		<i>Chloranthus glaber</i>		<i>Asplenium antiquum</i>	
	summer	winter	summer	winter	summer	winter	summer	winter
Temperature(°C)	26.4±0.09	7.8±0.45	24.1±0.29	0.13±0.30	23.5±0.28	1.2±0.23	23.5±0.33	1.4±0.17
Humidity(%)	97.3±0.44	85.6±1.60	97.7±0.18	90.7±1.29	98.7±0.09	90.0±1.06	96.0±0.45	84.3±1.23
Light intensity ($\mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$)	9.3±1.15	0	46.9±0.88	0	1.3±0.08	0	0.44±0.02	0
F extremes								
Fo	395±6.8	425±9.4	369±9.8	381±5.4	517±5.3	652±9.0	449±3.6	547±9.3
Fm	2516±46.5	1093±66.9	1874±43.5	1496±81.7	3271±38.2	2682±94.3	2907±15.9	2690±68.2
Fv/Fo	4.9±0.05	1.4±0.11	3.9±0.10	2.8±0.2	4.9±0.05	3.0±0.17	4.7±0.04	3.3±0.14
F dynamics								
Vj	0.83±0.005	0.51±0.008	0.84±0.009	0.25±0.005	0.97±0.001	0.41±0.006	0.97±0.001	0.62±0.009
Vi	0.97±0.004	0.79±0.005	0.99±0.002	0.64±0.007	0.99±0.002	0.67±0.003	0.98±0.001	0.78±0.010
(dv/dt) _o	1.01±0.021	0.58±0.013	0.88±0.025	0.18±0.005	1.12±0.022	0.36±0.011	1.38±0.026	0.77±0.025
Areas								
Sm	39.9±0.95	65.6±2.35	54.7±2.48	93.4±1.76	20.2±0.46	65.1±0.82	17.9±0.39	39.0±1.21
N	48.2±1.27	74.8±3.04	56.2±2.26	66.9±1.56	23.2±0.67	57.4±1.96	25.4±0.52	47.6±1.21
Sm/Tmax	0.09±0.004	0.07±0.002	0.07±0.003	0.09±0.002	0.03±0.002	0.07±0.001	0.04±0.001	0.04±0.001

F_v/F_o 의 감소를 볼 수 있었는데, 문주란이 다른 종에 비해 그 감소폭이 큰 것으로 나타났으며, 이는 Fig. 2-6에서 확인할 수 있었다. 그리고 겨울철에 V_j 와 $(dv/dt)_o$ 의 감소, S_m , N 의 증가는 4종에서 공통적인 현상으로 나타나 겨울철 환경요인의 영향을 받고 있음을 알 수 있다. O-J-I-P 곡선과 Table 2-1의 변수로부터 여러 가지 구조적·기능적 형광변수들을 산출하였다 (Table 2-2). 반응중심 당 광계II활성 (activities/RC)을 의미하는 변수들 중 ET_o/RC 가 모든 종에서 겨울철에 증가하는 양상을 보였다. 이는 여름철에 비해 겨울철에 반응중심당 포획된 에너지양이 적는데, 이 에너지의 대부분을 전자전달반응에 사용하고 있어서 과다한 여기에너지에 대한 적응력이 상대적으로 낮음을 반영하고 있다. 광계II 형광수율 (fluxes ratios or yields)을 의미하는 변수들은 겨울철에 Φ_{PO} 의 감소와 Ψ_o 와 Φ_{EO} 의 증가를 볼 수 있었다. 그리고 엽면적 당 활성상태의 반응중심의 밀도 (RC/CS)를 의미하는 변수들 (RC/CS_o , RC/CS_m)은 종에 따라 차이를 보이는데 문주란에서는 겨울철에 감소하는데 반해 박달목서와 죽절초에서는 증가하는 경향을 보여 저온 스트레스에 대한 내성이 다른 것으로 보이며, 문주란이 겨울철 환경요인의 변화에 가장 민감한 것으로 보인다. 엽면적 당 광계II활성 (activities/CS)을 의미하는 변수들 중 ET_o/CS_o 는 모든 종에서 겨울철에 증가하는 경향을 보였으며, ET_o/CS_m 은 문주란을 제외한 3종에서 큰 폭으로 증가하였다. 그리고 겨울철에 ABS/CS_m 과 TR_o/CS_m 이 감소하였는데 문주란에서 감소폭이 큰 것으로 나와 문주란이 겨울철 환경조건에 의한 영향을 민감하게 받는 것으로 보인다. 활력도 (vitality indexes)는 모든 종에서 겨울철에 SFI_{po} , PI_{po} 와 $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ 의 증가와 $\Phi_{po}/(1-\Phi_{po})$ 의 감소를 볼 수 있었으며, 그 변화폭은 문주란이 가장 낮고, 박달목서가 높은 것으로 나타나 박달목서가 겨울철 환경요인의 영

향을 덜 받거나 적응능력이 높은 것으로 보이며 문주란은 상대적으로 환경의 영향에 민감하게 반응하는 것으로 보인다. 이는 겨울철에 4종 모두에서 Φ_{PO} 가 감소하는데 문주란은 0.53으로 여름철에 비해 대략 37% 감소한데 반해, 다른 3종의 식물은 0.72~0.76의 범위로 대략 10% 이내의 범위로 미약하게 감소한 것으로 알 수 있다.

여름철 O-J-I-P 곡선의 일변화적 양상을 나타내었다 (Fig. 2-7A). 햇별이 잘 드는 곳에서 자라는 문주란과 박달목서에서는 거의 유사한 양상을 보이지

Table 2-2. Seasonal changes of different structural and functional parameters provided by the JIP-test, calculated from the data of Table 2-1 and the fluorescence transients O-J-I-P presented in Fig. 2-6.



Parameters	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>japonicum</i>		<i>Osmanthus insularis</i>		<i>Chloranthus glaber</i>		<i>Asplenium antiquum</i>	
	summer	winter	summer	winter	summer	winter	summer	winter
Temperature(°C)	26.4±0.09	7.8±0.45	24.1±0.29	0.13±0.30	23.5±0.28	1.2±0.23	23.5±0.33	1.4±0.17
Humidity(%)	97.3±0.44	85.6±1.60	97.7±0.18	90.7±1.29	98.7±0.09	90.0±1.06	96.0±0.45	84.3±1.23
Light intensity ($\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$)	9.3±1.15	0	46.9±0.88	0	1.3±0.08	0	0.44±0.02	0
Fluxes-activities per RC								
ABS/RC	1.45±0.031	2.43±0.17	1.31±0.04	1.03±0.05	1.39±0.03	1.23±0.06	1.73±0.033	1.63±0.040
TRo/RC	1.20±0.024	1.13±0.019	1.04±0.03	0.72±0.016	1.15±0.02	0.88±0.026	1.42±0.026	1.24±0.028
ETo/RC	0.14±0.007	0.55±0.014	0.16±0.009	0.54±0.013	0.04±0.002	0.52±0.017	0.05±0.001	0.47±0.012
Fluxes ratios = Yields								
TRo/ABS = Φ_{Po}	0.83±0.001	0.53±0.018	0.80±0.003	0.72±0.016	0.83±0.001	0.73±0.013	0.82±0.001	0.76±0.009
ETo/TRo = Ψ_{O}	0.17±0.005	0.49±0.008	0.16±0.009	0.75±0.005	0.03±0.001	0.59±0.006	0.03±0.001	0.38±0.009
ETo/ABS = Φ_{EO}	0.14±0.003	0.25±0.008	0.10±0.012	0.54±0.013	0.03±0.001	0.44±0.009	0.03±0.001	0.29±0.010
Density of RCs								
RC/CSo	296±6.8	223±13.5	294±8.4	399±18.9	403±10.2	581±20.7	298±7.2	389±6.0
RC/CSm	1758±50.2	626±66.6	1455±44.2	1624±134.3	2380±53.6	2420 ^{±175} ₉	1702±37.6	1683±70.5
Fluxes-activities per CS								
ABS/CSo	425±7.6	439±10.5	381±10.5	386±5.7	552±5.4	679±8.7	509±4.8	630±8.7
TRo/CSo	353±6.3	240±12.0	303±7.9	279±8.9	459±4.4	496±7.6	420±3.4	477±6.0
ETo/CSo	61±3.0	113±5.0	46±2.3	209±6.9	15±0.6	294±4.6	14±0.4	181±4.5
ABS/CSm	2516±46.5	1093±66.9	1874±43.5	1496±81.7	3271±38.2	2682±94.3	2907±15.9	2690±68.2
TRo/CSm	2090±39.8	654±59.5	1493±34.4	1110±77.6	2718±34.4	2003±98.7	2398±13.4	2060±71.5
ETo/CSm	355±10.2	304±26.8	230±11.6	832±59.6	88±3.5	1185±57.4	79±2.3	791±39.8
Vitality indexes								
10*SFI _{Po}	0.93±0.030	1.35±0.099	0.98±0.066	5.63±0.322	0.20±0.001	3.85±0.231	0.16±0.006	1.84±0.097
(RC/ABS)	0.67±0.016	0.49±0.022	0.78±0.021	1.02±0.041	0.73±0.017	0.87±0.039	0.59±0.013	0.62±0.016
$\Phi_{\text{Po}}/(1-\Phi_{\text{Po}})$	4.88±0.050	1.40±0.109	3.94±0.060	2.83±0.181	4.92±0.047	3.00±0.170	4.72±0.040	3.31±0.142
$\Psi_{\text{O}}/(1-\Psi_{\text{O}})$	0.20±0.006	0.99±0.034	0.19±0.012	3.01±0.076	0.03±0.001	1.48±0.036	0.03±0.001	0.62±0.024
PI _{Po}	0.46±0.023	0.54±0.087	0.60±0.048	9.40±0.930	0.12±0.005	4.08±0.394	0.09±0.004	1.37±0.130

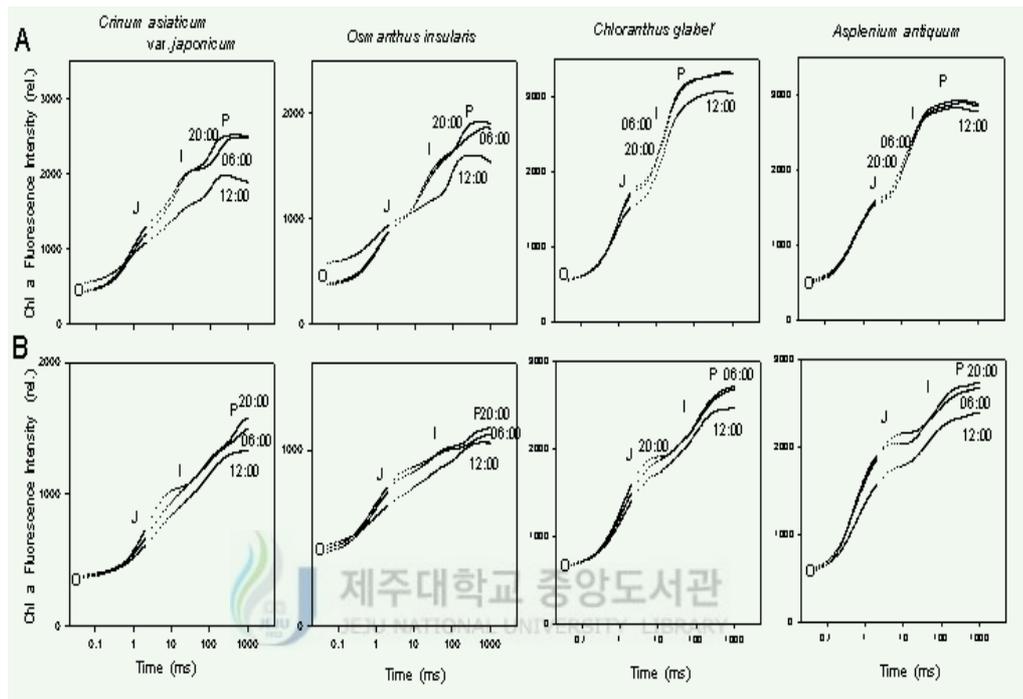


Figure 2-7. The fluorescence transients recorded in leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*, *Osmanthus insularis*, *Chloranthus glaber* and *Asplenium antiquum* under the natural conditions in summer (A) and winter (B). The presented transients were measured at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00).

만 낮에는 O-단계를 제외한 전 단계에서 새벽이나 밤보다 낮아졌다. 특히 낮 시간 P-단계의 저하는 F_v/F_m 의 감소를 야기하는 결과이다. 그리고 죽절초와 파초일엽의 OJIP곡선은 낮에 P-단계에서의 엽록소형광이 다소 감소하였지만 일변화적 특징이 두드러지지 않아 F_v/F_m 의 변화가 거의 없음을 나타내 주고 있다. 겨울철의 경우 (Fig. 2-7B), 4종 모두 낮시간에 전 단계에서 엽록소형광이 감소하여 겨울철 저온에 의한 영향을 받고 있음을 나타내주고 있는 것으로 보인다. 그리고 문주란과 박달목서에서는 새벽, 낮, 밤에 따라 큰 변화를 보이지 않아, 이들 식물이 겨울철의 저온 스트레스에 의해 비가역적인 손상을 입은 결과로 보인다. 반면에 죽절초와 파초일엽은 낮시간에 P-단계에서의 엽록소형광이 다소 감소하였다.

2.2. 주요 엽록소형광 변수의 변화

여름철과 겨울철 아열대성 식물 4종의 환경요인과 엽록소형광의 변화를 살펴보았다 (Figs. 2-8, 2-9). 문주란과 박달목서가 서식하고 있는 지역은 빛에 노출되어 있는 양지이며, 죽절초와 파초일엽의 서식하고 있는 지역은 음지에 해당한다.

여름철 이들 식물이 서식하고 있는 지역의 온도는 양지와 음지에 관계없이 23~33℃이며, 상대습도는 낮시간에 65~75%, 새벽과 밤에는 95% 이상의 높은 상대습도를 유지하였다. 그리고 문주란과 박달목서가 서식하고 있는 지역의 측정당시 광량은 낮시간에 730~800 $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 이며, 죽절초와 파초일엽이 서식하고 있는 지역은 50 $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 이하의 낮은 광량이 미치고 있다 (Fig. 2-8). 여름철 엽록소형광의 일변화를 살펴 본 결과, 양지에 서식하고 있는 문주란과 박달목서의 F_v/F_m 은 새벽과 밤에는 0.80~0.83 범위의 높은 값을 나타내었지만, 낮시간에는 0.65~0.73으로 낮아졌다. 낮시간의 F_v/F_m 의 감소는 자연상태에서 서식하고 있는 식물뿐만이 아니라, 최적의 환경조건에서 자라고 있는 식물에서도 널리 볼 수 있는 현상이다 (Ögren and Evans, 1992). 그리고 낮시간에 F_v/F_m 의 감소 시 F_o 의 증가를 수반하고 있어서 이를 낮시간의 일변화적 광억제 또는 만성적인 광억제 현상이라고 할 수 있으며, 광합성의 양자 수율에 있어서 일변화적 패턴과 관련이 있다

(Long *et al.*, 1994). 그리고

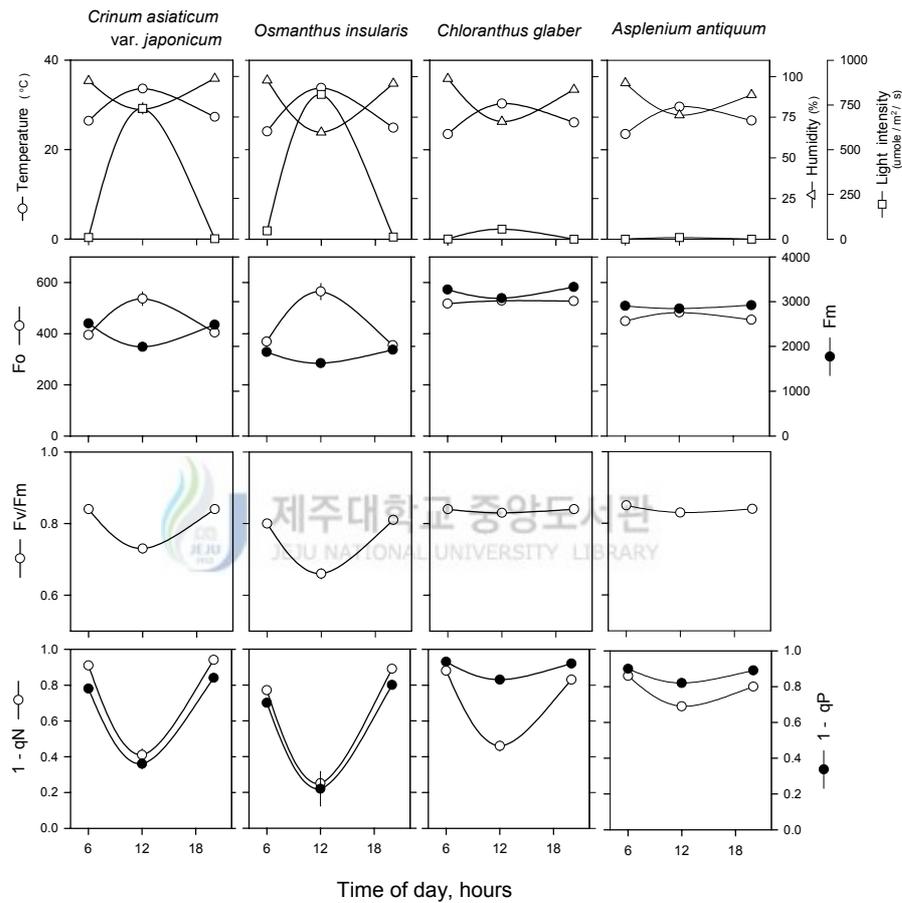


Figure 2-8. Diurnal variation of environmental factors (temperature, light density, and relative humidity) and chlorophyll fluorescence parameters (F_o , F_m , F_v/F_m , $1-q_N$ and $1-q_P$) from leaves of 4 tropical/subtropical plant species in summer. The values represent the averages \pm SE of 60 independent measurements.

만성적인 광억제는 광계Ⅱ 반응중심의 손상 또는 불활성상태를 반영하는데, 태양광선이 감소하는 오후에 F_v/F_m 이 원래 상태로 회복되는 것으로 보아 여름철 낮시간에 F_v/F_m 의 감소는 주로 광계Ⅱ 반응중심의 가역적인 불활성화에 기인한 것으로 보인다. 음지에 서식하고 있는 죽절초와 파초일엽의 F_v/F_m 은 0.83~0.85 범위의 높은 값을 보였으며, 일변화적 특성은 나타나지 않아 서식지의 낮은 광조건을 반영하고 있다고 할 수 있다. 그리고 F_v/F_m 과 F_m 은 양지에 서식하고 있는 식물보다 음지에 서식하는 식물에서 높은 것으로 보고된 바 있는데 (오 등, 1999), 본 연구에서도 음지에 서식하는 죽절초와 파초일엽이 양지에 서식하는 문주란과 박달목서 보다 다소 높은 값을 보여 서식지의 환경조건을 반영하고 있음을 알 수 있다. 한편, 광합성에 필요한 양보다 과다한 양의 빛에너지가 흡수되었을 때 여기에너지는 열의 형태로 방출하거나 광합성 명반응의 초기 광화학 반응에 이용하는 등 여러 가지 방법을 통하여 광손상에 대한 피해를 최소화할 수 있다 (Huner *et al.*, 1998). 이는 비광화학적 형광소멸과 광화학적 형광소멸의 변화를 분석함으로써 알 수 있다. 문주란과 박달목서는 $1-q_N$ 과 $1-q_P$ 가 낮시간에 큰 폭으로 낮아졌다가 밤에는 증가하는 경향을 보여 여름철의 높은 광량에 의한 광손상으로부터 식물체를 보호하는 것으로 보인다. 그리고 음지에 자라는 죽절초와 파초일엽은 $1-q_P$ 의 변화는 거의 없었으나, $1-q_N$ 이 낮시간에 다소 감소하는 경향을 보여 음지에 적응된 식물들도 나름대로의 보호기구에 의해 광손상으로부터 식물체를 보호하는 것으로 보인다. 그리고 여름철 낮시간의 여기된 에너지의 비광화학적인 소멸은 광계Ⅱ복합체의 광저해에 따른 소멸 (q_I)로 나타나고 있다.

4종의 아열대성 식물의 생육상태, 즉 엽록소형광에 미치는 환경요인의 영향을 알아보기 위하여, 측정당시 환경요인 (온도, 상대습도, 광량)과 형광변수들 중에 F_0 , F_m , F_v/F_m , $1-q_N$, $1-q_P$ 의 일변화 자료를 바탕으로 여름철 환경요인과 엽록소형광과의 상관관계를 분석하였다 (Table 2-3). F_v/F_m 는 4종 모두에서 온도와 상대습도와 각각 1% 수준에서 음의 상관관계와 정의 상관

관계를 보였으며, 광량과는 문주란, 박달목서, 죽절초는 1% 수준에서 그리고 파초일엽은 5% 수준에서 음의 상관관계가 인정되었다. Fo는 4종에서 모두 광량과는 1% 수준에서 정의 상관관계가 인정되었으나, 온도나 상대습도와는
 종에 따라

Table 2-3. Relationships between environmental factors and chlorophyll fluorescence parameters of four subtropical plant species under natural field conditions in summer.

Species	Environmental factors	Chlorophyll fluorescence parameters				
		Fo	Fm	Fv/Fm	1-qN	1-qP
<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>japonicum</i>	Temperature	0.420**	-0.459**	-0.622**	-0.768**	-0.689**
	Humidity	-0.423**	0.437**	0.621**	0.740**	0.720**
	Light intensity	0.486**	-0.448**	-0.689**	-0.807**	-0.792**
<i>Osmanthus insularis</i>	Temperature	0.625**	-0.488**	-0.796**	-0.884**	-0.609**
	Humidity	-0.676**	0.529**	0.861**	0.915**	0.638**
	Light intensity	0.683**	-0.513**	-0.862**	-0.930**	-0.648**
<i>Chloranthus glaber</i>	Temperature	0.270*	-0.607**	-0.703**	-0.817**	-0.749**
	Humidity	-0.225*	0.453**	0.550**	0.869**	0.672**
	Light intensity	0.277**	-0.622**	-0.752**	-0.798**	-0.834**
<i>Asplenium antiquum</i>	Temperature	0.154	-0.391**	-0.445**	-0.870**	-0.809**
	Humidity	-0.218*	0.180	0.345**	0.671**	0.892**
	Light intensity	0.295**	0.218	-0.254*	-0.262*	-0.660**

** significant at the 0.01 level, * significant at the 0.05 level

차이를 보였다. 즉, 문주란과 박달목서에서 온도와 1% 수준에서 정의 상관관계가, 상대습도와는 1% 수준에서 음의 상관관계가 인정되었다. 그러나 죽절초는 5% 수준에서 온도와 정의 상관관계가, 상대습도와는 음의 상관관계가 인정되었고, 파초일엽은 온도와는 유의성이 없는 것으로 나타났으며, 상대습도와 5% 수준에서 음의 상관관계가 인정되었다. F_m 은 문주란, 박달목서, 죽절초에서 전반적으로 F_v/F_m 와 환경요인과의 상관관계와 유사한 특성을 보였으며, 파초일엽은 온도와 1% 수준에서 음의 상관관계가 인정되었으나, 상대습도나 광량과는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 그리고 $1-qN$ 과 $1-qP$ 도 F_v/F_m 와 환경요인과의 상관관계와 유사한 특성을 보였다. 이러한 결과를 토대로 양지에 자라는 문주란과 박달목서는 여름철 환경요인의 변화에 대해 서로 유사한 특성을 보이며, Fig. 2-8의 F_v/F_m 의 변화에서 보는 바와 같이 낮시간의 F_v/F_m 의 감소는 온도와 광량이 증가와 밀접한 관계를 가지고 있음을 보여준다. 그리고 죽절초는 F_o 가 다소 차이를 보이거나 전반적으로 문주란과 박달목서와 유사한 것으로 나타나 높은 광량하에서는 문주란과 박달목서에서처럼 F_v/F_m 의 감소가 나타날 수 있음을 보여준다. 그리고 이들 식물은 환경의 변화에 민감하게 반응하고 있음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

겨울철 환경요인과 엽록소형광의 일변화 양상을 살펴보면 (Fig. 2-9), 문주란이 서식하고 있는 지역의 온도는 새벽과 밤에는 10°C 이하의 낮은 온도를 보였으나, 낮시간에 다소 상승하여 16°C 를 나타내었다. 그리고 문주란을 제외한 나머지 3종의 식물이 서식하고 있는 지역의 온도는 10°C 이하의 낮은 온도를 나타내었다. 상대습도는 낮시간에 다소 낮아졌으나 60% 이상의 높은 상대습도를 보였으며, 광량은 문주란과 박달목서가 서식하고 있는 양지에서 낮시간에 각각 200과 $500 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 광량을 나타내었다. 4종의 아열대성 식물을 대상으로 겨울철 엽록소형광의 변화를 살펴보면, F_v/F_m 은 여름철에 비해 낮아져 0.8 이하의 값을 보여, 겨울철 환경의 영향을 받고 있음을 알 수 있다. 특히 문주란의 F_v/F_m 은 다른 3종 보다 더 낮은 값을 보여 0.50~

0.53의 범위의 값을 나타내었다. 이러한 겨울철 F_v/F_m 의 감소는 F_m 의 감소와 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 즉, 겨울철 F_m 값은 여름철에 비해 크게 낮아져 겨울철 저온에 의한 F_v/F_m 의 감소를 야기한 것으로 보인다. 한편, 저온

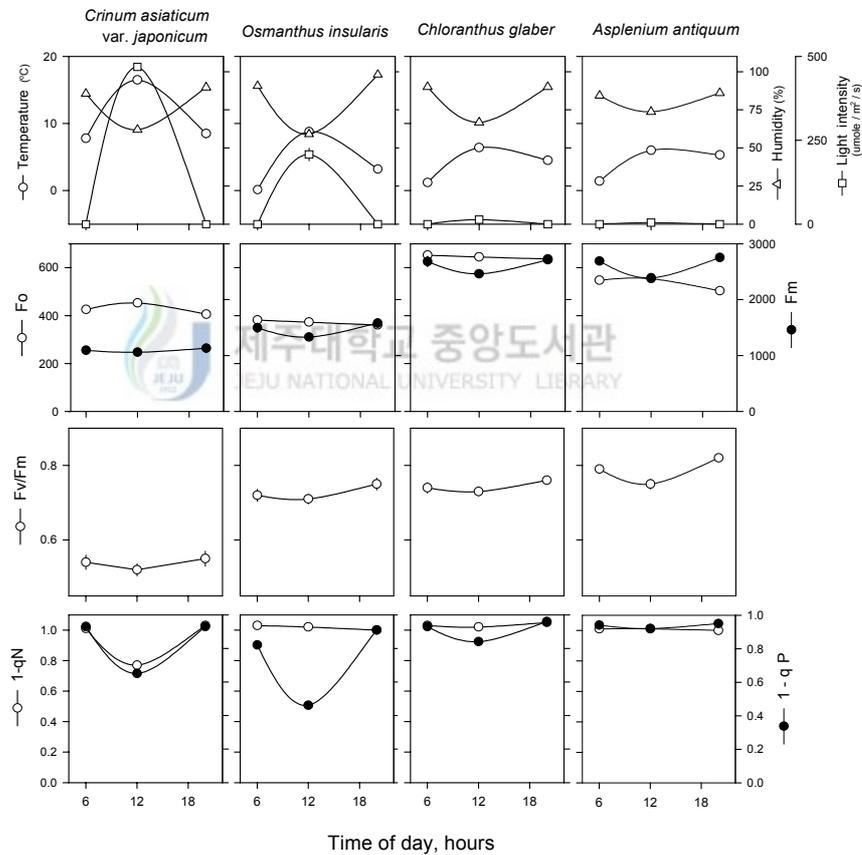


Figure 2-9. Diurnal variation of environmental factors (temperature, light

density, and relative humidity) and chlorophyll fluorescence parameters (F_o , F_m , F_v/F_m , $1-q_N$ and $1-q_P$) from leaves of 4 tropical/subtropical plant species in winter. The values represent the averages \pm SE of 60 independent measurements.

에 민감한 식물들의 잎이 저온과 함께 광에 노출시켰을 때 광억제가 촉진되는 것으로 알려지고 있다 (Powles, 1984; Öquist *et al.*, 1987). 하지만, 본 실험에서 이들 4종의 아열대성 식물들은 겨울철 낮시간에 빛에 의한 F_v/F_m 의 감소는 적었다. 겨울철 $1-q_N$ 의 일변화를 살펴보면, 문주란은 새벽과 밤에 0.9 이상의 높은 값을 보이지만, 낮시간에 다소 감소하여 낮시간에 여기된 에너지의 일부를 열의 형태로 방출하여 저온과 광에 의해 광계II의 반응중심이 손상을 미약하게나마 완화시키는 것으로 보인다. 그러나 문주란을 제외한 나머지 3종의 식물은 $1-q_N$ 이 0.9 이상의 높은 값을 보여, 식물체가 저온에 의한 스트레스를 받고 있음을 알 수 있다. 그리고 $1-q_P$ 의 일변화를 살펴보면, 문주란과 박달목서는 새벽과 밤에는 0.9 이상의 높은 값을 보이는데 반해, 낮시간에 각각 0.5와 0.6의 값으로 낮아져 낮시간에 여기에너지의 일부를 광화학적 형광 소멸의 형태로 방출하는 것으로 보인다.

겨울철 4종의 아열대성 식물의 엽록소형광과 환경요인과의 상관관계를 분석한 결과 (Table 2-4), F_v/F_m 는 상대습도와는 4종 모두에서 1% 수준에서 정의 상관관계가 인정되었다. 광량의 변화와는 생육환경에 따라 차이를 보이는데, 양지에 자라는 문주란과 박달목서에서는 유의성이 없는 것으로 나타났으나, 음지에 자라는 죽절초와 파초일엽은 1% 수준에서 음의 상관관계가 인정되어 저온과 더불어 강한 빛이 가해진다면 식물의 생육에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 온도와는 문주란에서만 1% 수준에서 정의 상관관계가 인정되었으며, 다른 3종의 식물에서는 유의성이 없는 것으로 나타나 문주란이 저온에 가장 민감하게 반응하고 있음을 알 수 있다. 그리고 문주란의 F_o 나 F_m 이 온도와 1% 수준에서 정의 상관관계를 보여 겨울철 저온에 의한 문주란의 F_v/F_m 의 변화는 F_o 와 F_m 의 변화에 기인한 것으로 해석할 수 있다. $1-q_N$ 은 문주란에서 온도와 1% 수준에서 음의 상관관계가 인정되었으나, 상대습도

나 광량과는 문주란, 박달목서, 죽절초에서만 유사한 상관관계 특성을 보여 상대습도와는 정의 상관관계가, 광량과는 음의 상관관계가 인정되었다. 1-qP 는 4종 모두 유사한 특성을 보여 온도나 광량과는 1% 수준에서 음의 상관관계가, 상대습도와는 1% 수준에서 정의 상관관계가 인정되었다. 이러한 결과를 토대로 서식하는 지역의 특성과 종에 따라 환경요인의 변화에 대한 식물의 반응 기작이

Table 2-4. Relationships between environmental factors and chlorophyll fluorescence parameters of four subtropical plant species under natural field conditions in winter.

Species	Environmental factors	Chlorophyll fluorescence parameters				
		Fo	Fm	Fv/Fm	1-qN	1-qP
<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>japonicum</i>	Temperature	0.401**	0.499**	0.509**	-0.575**	-0.056
	Humidity	0.002	0.112**	0.179**	0.363**	0.637**
	Light intensity	0.138**	-0.011	-0.059	-0.529**	-0.572**
<i>Osmanthus insularis</i>	Temperature	-0.066	-0.067	0.044	-0.006	-0.722**
	Humidity	-0.002	0.332**	0.281**	-0.208*	0.966**
	Light intensity	-0.013	-0.199	-0.095	0.209*	-0.845**
<i>Chloranthus glaber</i>	Temperature	-0.125	0.020	0.112	0.127	-0.307**
	Humidity	-0.252*	0.515**	0.431**	0.566**	0.879**
	Light intensity	0.127	-0.421**	-0.357**	-0.593**	-0.792**
<i>Asplenium antiquum</i>	Temperature	-0.556**	-0.340**	-0.099	0.022	-0.658**
	Humidity	0.375**	0.500**	0.440**	-0.016	0.694**
	Light intensity	-0.287**	-0.343**	-0.276**	-0.084	-0.820**

** significant at the 0.01 level, * significant at the 0.05 level

다소 차이를 보이고 있으며, 문주란이 겨울철 환경요인의 변화, 특히 저온에 가장 민감하게 반응하고 있음을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합해보면, 식물종에 따라 다소의 차이는 있으나 4종 모두 겨울철에 Fv/Fm이 감소하였으며, 문주란은 다른 3종 보다 감소폭이 커서 겨울철 저온 스트레스에 민감한 것으로 나타났다. 이는 본 실험의 결과로부터 추측해볼 때, 문주란은 다른 식물과 마찬가지로 겨울철에 peroxidase 활성과 isoenzyme이 특이적으로 나타났으나, 박달목서와 죽절초와는 달리 catalase 활성이 겨울철에 낮고, SOD와 APX도 뚜렷한 차이를 보이지 않아 겨울철 환경의 변화에 효율적으로 대처하지 못하는 것으로 보인다. 이에 반해 박달목서는 겨울철에 Fv/Fm이 다소 감소하였으나 대략 0.73의 범위에 존재하는데, 이는 SOD, peroxidase, catalase 활성이 겨울철에 높아 문주란에 비해 겨울철 저온에 의해 생길 수 있는 산화적 스트레스에 의한 손상을 제한함으로써 나타나는 결과로 사료된다. 그리고 엽록소형광과 환경요인과의 상관관계를 분석해본 바에 의하면, 여름철에는 4종 모두 낮시간의 높은 광량에 의해 영향을 받는 것으로 보이며, 겨울철에는 종에 따라 다소 차이를 보이는데, 특히 문주란의 Fv/Fm은 온도와 1% 수준에서 정의 상관관계가 인정되어 온도의 변화가 식물체에 영향을 미치는 것으로 보인다,

4. 요 약

아열대성 식물 4종 (문주란, *Crinum asiaticum* var. *japonicum*; 박달목서, *Osmanthus insularis*; 죽절초, *Chloranthus glaber*; 파초일엽, *Asplenium antiquum*)을 대상으로 자연 환경요인의 변화에 의한 항산화효소 (SOD, peroxidase, catalase, APX)의 활성과 isoenzyme 패턴의 변화를 전기영동으로 조사하였으며, 엽록소형광과 O-J-I-P 곡선의 분석을 통해 식물의 생리적 상태를 진단하고자 하였다.

항산화효소들 중에 peroxidase의 활성과 isoenzyme 패턴이 식물종이나 환경조건에 따라 가장 다양하게 나타났다. Peroxidase는 4종 모두에서 여름철보다 겨울철에 활성이 높았고 문주란, 박달목서, 파초일엽에서는 겨울철에 특이적으로 검출되는 isoenzyme들도 관찰할 수 있었다. 종별로는 문주란, 파초일엽에서 4종의 항산화효소가, 박달목서에서는 APX를 제외한 3종의 효소가 검출되었으나, 죽절초에서는 peroxidase만 검출되었다. 식물종에 따라 또는 환경요인의 변화에 따라 항산화효소의 활성 또는 isoenzyme 패턴의 차이를 보이고 있지만 항산화효소의 계절적 그리고 일주기적 변화가 관찰되어, 본 연구에서 조사된 4종의 아열대성 식물이 자연환경 조건 하에서도 산화적 스트레스 하에 처하고 있는 것으로 보인다. 여름철과 겨울철 O-J-I-P 곡선의 패턴을 비교해보면, 4종 모두 여름철에 비해 겨울철에 O-단계에서의 상대적인 형광세기는 증가하고, P-단계에서의 형광세기는 감소하였다. 특히 문주란에서 P-단계의 감소가 현저하게 나타나 다른 3종 보다 겨울철 저온 스트레스에 민감한 것으로 보이며, 이는 다른 종에 비해 Fv/Fm이 겨울철에 큰 폭으로 감소한 것으로 알 수 있었다. 그리고 겨울철 Fv/Fm은 모든 종에서 0.8 이하의 낮은 값을 나타내어 겨울철 저온의 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 종에 따라 다소의 차이가 있으나 O-J-I-P 곡선으로부터 산출된 여러 형광변수들 중에서 겨울철에 4종 모두에서 Fo, Sm, N 등의 형광변수들의 증가와 Fm, Fv/Fo 등의 변수들의 감소가 관찰되었다. 한편, 여름철 일변화에 있어서 문주란과 박달목서의 O-J-I-P 곡선은 거의 유사하며 낮에 뚜렷하게 낮았고, 죽절초와 파초일엽에서는 일변화적 특성은 두드러지지 않았다. 그리고

양지에 자라는 문주란과 박달목서는 F_v/F_m 이 새벽과 밤에는 0.80~0.83 범위의 높은 값을 보이지만 낮시간에는 0.65~0.73으로 낮았져, 낮시간의 고광에 의한 광억제가 나타나는 것으로 보인다. 그러나 $1-qN$ 과 $1-qP$ 도 낮시간에 크게 낮아져 여기에너지의 일부를 열의 형태로 방출하여 광피해를 완화시키고 있는 것으로 보인다. 여름철 음지에 자라는 죽절초와 파초일엽의 F_v/F_m 은 높아서 0.83~0.85 범위를 계속 유지하였으며 일변화적 특성은 관찰되지 않았다. $1-qP$ 의 변화는 거의 관찰되지 않았으나 $1-qN$ 이 낮시간에 다소 감소하는 경향을 보여 주었다. 겨울철에는 모든 종에서 낮시간에 O-J-I-P 곡선이 다소 낮아졌으나, F_v/F_m 의 일변화적인 특성은 관찰되지 않았다. $1-qN$ 은 문주란에서만 낮시간에 다소 감소하였고, $1-qP$ 는 문주란과 박달목서에서는 낮시간에 0.6 범위로 낮아졌다. 이는 종에 따라 차이가 있지만 겨울철 저온의 영향을 받은 결과로 보인다.



Ⅲ. 문주란의 항산화효소와 엽록소형광의 계절적 변화

1. 서 론

식물은 다양한 환경요인의 변화, 즉 환경스트레스하에 노출되어 있으며, 환경조건에 적응하기 위해 여러 가지 생리적 변화를 겪으면서 성장한다. 특히, 온도는 식물의 지리적 분포와 생존, 그리고 생산량의 감소에 직결되는 중요한 환경인자로 작용한다. 특히, 열대 및 아열대 식물들은 저온에 민감하게 반응하여 10℃ 미만의 온도에 노출되면 대사작용에 이상현상이 유발되며 수 시간 또는 수일 내에 식물체에 심각한 파괴 또는 사멸을 초래하게 되며, 이는 저온이 가해졌을 때 발생하는 활성산소가 주된 역할을 하는 것으로 알려졌다 (Allen and Ort, 2001). 광합성은 식물세포의 가장 중요한 대사과정 중 하나로서 환경요인에 따라 매우 민감하게 반응하는데 식물이 저온에 노출될 때 광합성 과정이 먼저 영향을 받게 된다 (Hetherington *et al.*, 1989). 즉, 식물이 스트레스를 받으면 직·간접적으로 식물의 광합성 기구를 변화시키거나 손상을 주어 엽록소형광의 변화를 초래한다.

문주란 (*Crinum asiaticum var. japonicum*)은 일본, 한국 등에 분포하고 있는 아열대성 식물이다. 우리나라에서는 제주도에만 분포하고 있는 종으로 북제주군 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 고사하여 겨울을 지나게 된다. 그리고 문주란을 포함한 4종의 아열대성 식물을 대상으로 광계Ⅱ의 광합성효율 (Figs. 2-8, 2-9)과 항산화효소 활성 (Figs. 2-2~2-5)을 조사해 본 결과, 문주란이 저온에 가장 민감한 것으로 분석되었다.

따라서, 본 연구는 환경요인의 변화, 특히 겨울철 저온에 의한 아열대성 식물의 반응기구를 규명하고 환경스트레스에 대한 식물의 생리적 상태를 진

단할 수 있는 지표를 제시하고자, 저온감수성 식물인 문주란을 대상으로 수종의 항산화효소의 활성변화, 엽록소형광과 O-J-I-P 패턴의 변화를 조사하였다.



2. 재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에서는 북제주군 구좌읍 하도리 토끼섬 (난도) 일대의 해변사구에 자생하고 있는 문주란 (*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)을 사용하였다. 문주란은 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 일대의 기상자료 (2001년 7월 1일부터 2002년 2월 28일까지) 중 온도, 상대습도, 강우량의 변화를 분석하였다 (성산포 기상관측소 자료). 그리고 엽록소형광 측정 당시의 조사지역 환경요인으로 온도와 상대습도, 광량을 조사하였으며, 측정 방법은 2장에 기술한 방법과 동일하다.

3. 항산화효소의 활성분석

항산화효소는 SOD, peroxidase, catalase, APX의 활성과 isoenzyme 패턴을 전기영동을 통해 살펴보았으며, 조효소액의 제조, 전기영동, 효소의 선별염색은 2장에 기술한 방법으로 실시하였다.

3. 엽록소형광의 측정 및 분석

3.1. O-J-I-P 분석

O-J-I-P (polyphasic rise of Chl a fluorescence transients) 패턴은 Strasser와 Strasser (1995)의 방법에 따라 2장에서 기술한 방법으로 Plant Efficiency Analyzer (PEA; Hansatech Instrument Ltd., UK)를 이용하여 측정 후 엽록소형광의 초기유도곡선으로 분석하였다.

3.2. 엽록소형광 측정

엽록소형광은 PEA를 이용하여 측정하였으며, 15분간 광을 차단하여 암 적응시킨 후 1초 간격으로 2회 연속 측정하였다. 2장에 제시한 방법을 사용하여 측정시에는 $1,500 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 광량을 1초간 조사하고 측정 사이에는 $150 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 낮은 광량을 10초 간 조사하였다 (오 등, 2001). 엽록소형광측정은 새벽 (06:00)에 측정하였으며, 매 측정 마다 20회 반복으로 측정하여 분석하였다.



3. 결과 및 고찰

1. 환경요인의 계절적 변화

아열대 또는 열대식물의 생육에 영향을 미치는 환경요인 중에 온도가 중요하게 작용하여 기온이 10℃ 이하가 되면 생장이 멈추고 0℃에서는 죽게 된다 (Allen and Ort, 2001). 본 연구를 수행한 기간 동안의 자생지 환경요인의 변화를 제시하였다 (Fig. 3-1). 여름철 (7~8월)은 월평균 25℃ 이상의 기온을 유지하였으며 최고온도는 월평균 30℃ 범위를, 최저온도는 월평균 23℃ 범위를 유지하였다. 그러나 9월 중순부터 기온이 점차 낮아지면서 11월부터는 월평균 기온이 10℃ 이하로 현저히 낮아졌다. 겨울철 (12월, 1~2월)에는 월평균 최고기온도 10℃ 안팎으로 낮아졌고, 월평균 최저기온은 2℃ 이내의 범위를 보였으나 실제적으로 0℃ 이하의 기온을 나타내는 기간도 많았다. 상대습도는 여름철에 대략 70% 범위의 높은 습도를 유지하였는데, 이는 여름철 장마의 영향에 기인한 결과로 사료되는데 강우의 빈도와 강우량의 변화로부터 알 수 있다. 그리고 겨울철의 상대습도는 여름철에 비해 다소 낮아지는 했으나 전반적으로 60% 범위를 유지하였다. 본 연구를 수행한 여름철에는 평균기온이 25℃ 범위를 보였으나, 겨울철에는 10℃ 이하로 낮아져 저온이 식물의 생장에 큰 영향을 미칠 것으로 사료된다. 이는 Figs. 2-8, 2-9의 아열대성 식물 4종에서 Fv/Fm의 계절적 변화에서도 알 수 있으며, 특히 문주란은 여름철에 0.83의 안정된 범위의 값을 보였으나, 겨울철에 0.53의 낮은 값을 보여 겨울철 저온스트레스에 의한 영향을 받고 있음을 알 수 있었다. 그리고 Figs. 2-2~2-5에 제시된 항산화효소의 활성에서도 문주란은 겨울철 저온에 의한 산화적 스트레스 상태에 있음을 알 수 있었다.

2. 항산화효소의 계절적 변화

Superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase, 그리고 ascorbate peroxidase (APX)의 계절적 변화를 전기영동패턴으로 살펴보았다 (Figs. 3-2, 3-3).

먼저, SOD isoenzyme 패턴을 보면 전체적으로 7개의 밴드가 검출되었

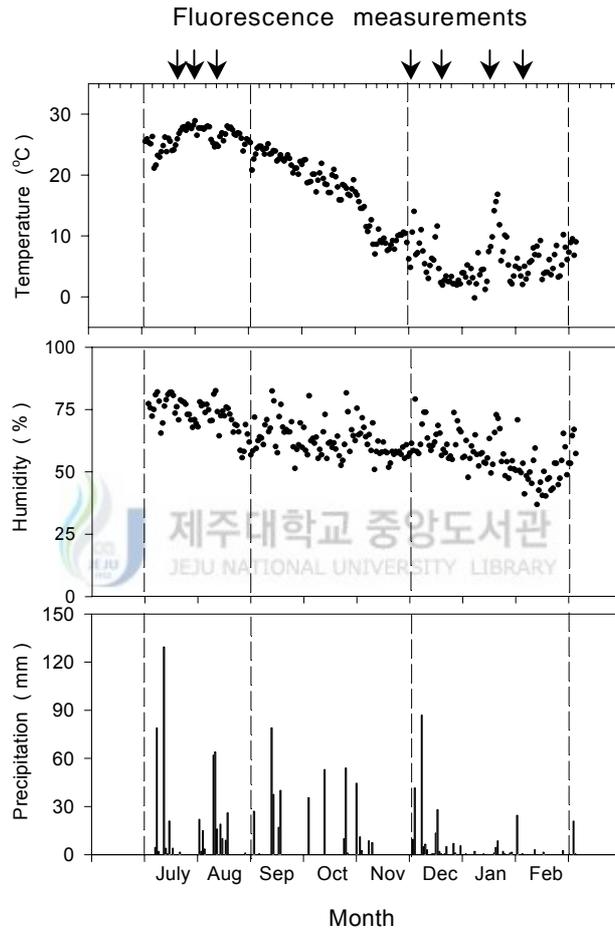


Figure 3-1. Seasonal variations of temperature, relative humidity of air, and precipitation determined from July, 2001 to February, 2002 in the Sungsanpo meteorological station near natural habitat of *Crinum*

asiaticum var. *japonicum* during this investigation period. The arrows indicate the days of fluorescence measurements.



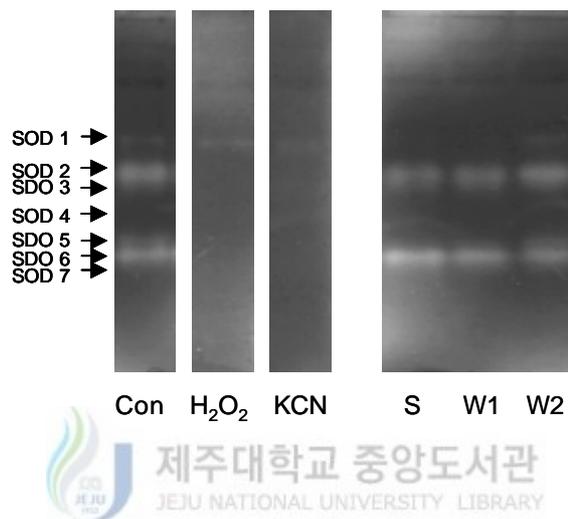


Figure 3-2. SOD isoenzyme profiles from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*, at dawn (06:00) in summer (S) and winter (W). The isoenzymes were identified with/without 1mM KCN or 3mM H₂O₂. Seven isoforms were detected in leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*, as indicated by the arrows. S, early August; W1, early December; W2, early February.

며, H₂O₂와 KCN에 의한 선택적 저해로부터 SOD 1은 Mn-SOD로, 나머지 6개의 isoenzyme (SOD 2~SOD 7)은 CuZn-SOD로 추정할 수 있었다 (Fig. 3-2). 그 중 2개의 isoenzyme (SOD 3과 SOD 5)은 효소활성, 즉 밴드의 강약에는 차이가 있지만 겨울철에만 특이적으로 검출되었고, SOD 4는 여름철에 특이적으로 검출되는 것으로 나타났다. SOD는 환경스트레스에 따라 활성의 변화가 다른 것으로 보고되고 있다 (Yu and Rengel, 1999). 문주란 앞에서 계절별 SOD활성은 여름철보다는 겨울철, 특히 2월 초에 해당하는 늦은 겨울에 다소 높은 활성을 보여 식물이 겨울철 환경요인에 의한 영향을 받고 있음을 시사한다고 할 수 있다. 그리고 이러한 결과는 오이를 4℃에서 배양했을 때 SOD와 H₂O₂ 활성이 증가와 저온에서 특이적인 SOD isoenzyme들이 미약하지만 검출된다는 보고와 유사한 결과이다 (Lee and Lee, 2000). 그리고 *Fagus sylvatica*와 *Coleus blumei*을 고온 (35℃)과 저온 (10℃)에서 2일간 배양했을 때 저온에서 두종 모두 SOD가 높은 활성을 보였고, 특히 *Coleus blumei*은 열대지방에서 자라는데 저온에서 SOD 활성이 3배 증가하였다 (Peltzer *et al.*, 2002).

Catalase는 단일 밴드로 검출되었는데 여름철에 비해 겨울철에 활성이 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 3-3A). 저온내성 식물인 호밀과 완두, 그리고 저온감수성 식물인 옥수수 (*Zea mays* L)와 오이 모두에서 암상태의 저온에서 catalase 활성이 크게 영향을 받지 않았다 (Feierabend *et al.*, 1992). 하지만 Lee와 Lee (2000)는 오이를 4℃의 저온에서 배양했을 때 catalase 활성이 감소하였다고 보고하여 본 실험결과와 유사하였다. Peroxidase isoenzyme은 전체적으로 4개의 밴드가 검출되었다 (Fig. 3-3B). 전반적으로 높은 활성을 지닌 peroxidase 1은 효소활성에는 차이가 있지만 계절에 관계없이 전체적으로 검출되었으며 특히 겨울철에 높은 활성을 보였다. 그리고 3개의 isoenzyme (peroxidase 2~4)은 겨울철에만 특이적으로 나타났다. 식물체에서 peroxidase는 바이러스, 미생물, 곰팡이의 감염에 의한 생물학적 스트레스와 고농도의 염, 상처, 온도 등의 비생물학적 스트레스에 반응해서 그 활성이 증가하는 것으로 보고된 바 있다 (Van Huystee, 1987). 본 연구에서도 문주란 앞의 peroxidase 활성은 여름철에 비해 겨울철에 더 높은 활성을

나타내었으며, 겨울철에만 특이적으로 나타나는 isoenzyme들도 있어 겨울철 환경스트레스에

대



Figure 3-3. Isoenzyme profiles of catalase (A), peroxidase (B) and ascorbate peroxidase (C) from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*, at dawn (06:00) in summer (S) and winter (W). S, early August; W1, early December; W2, early February.

한 문주란의 보호기작으로 볼 수 있다. 문주란의 계절별 APX isoenzyme 패턴을 살펴보면, 전체적으로 8개의 밴드가 검출되었다 (Fig. 3-3C). 그 중 APX 2는 겨울철에 특이적으로 검출되었고, 나머지 7개의 isoenzyme들은 효소활성에 다소의 차이는 있지만 계절에 관계없이 나타났으며, 늦은 겨울에 활성이 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 오이를 4°C의 저온 스트레스에서 배양했을 때 APX 활성과 APX isoenzyme들의 활성패턴에 있어서도 25°C의 대조구에 비해 증가하였다는 보고와 유사한 결과이다 (Lee and Lee, 2000).

이들 항산화효소들은 각종 스트레스에 의해 과다하게 생성되는 활성산소종을 제거하는 기능을 가지고 있으며, 저분자 항산화제와 마찬가지로 스트레스 하에서 식물의 생존 또는 내성과 관련이 있다 (Foyer *et al.*, 1991). 그리고 SOD, APX는 각종 스트레스에 의해 유도되거나 또는 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Walker and McKersie, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Hodges *et al.*, 1997). Figs. 3-2, 3-3에서 보는 바와 같이 계절별 항산화효소의 패턴을 종합해보았을 때, 문주란의 잎에서 나타나는 catalase는 여름철에, 그리고 SOD, peroxidase, APX는 여름철에 비해 겨울철에 다소 높은 활성을 나타내었고, 겨울철에만 특이적으로 나타나는 isozyme들도 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 오이를 4°C의 저온에서 배양했을 때 SOD, peroxidase, APX 활성은 증가하였고, catalase 활성은 감소하였다는 보고와 유사하다 (Lee and Lee, 2000). 따라서 catalase는 고온에 적응하기 위한 식물의 방어기작으로 생각되며, SOD, peroxidase는 저온과 관련이 있는 것으로 보인다. 그러나 이들 항산화효소의 활성이 여름철에 비해 겨울철에 높은 활성을 보인다고 하더라도 활성산소를 효율적으로 소거할 수 없다면 광합성 기구는 물론 세포전반에 영향을 미쳐 질병유발, 노화 및 세포사멸 등 심각한 손상을 가할 수 있을 것으로 생각된다.

3. O-J-I-P 곡선의 계절적 변화

겨울철 저온에 의한 문주란의 O-J-I-P 곡선을 여름철과 비교해보면 (Fig. 3-4A), 겨울철 저온의 축적됨에 따라 J, I, P-단계에서의 형광세기가 현저하게 감소하였다. 특히 P-단계에서의 형광세기 (F_p)는 광계II의 반응중심이 모두

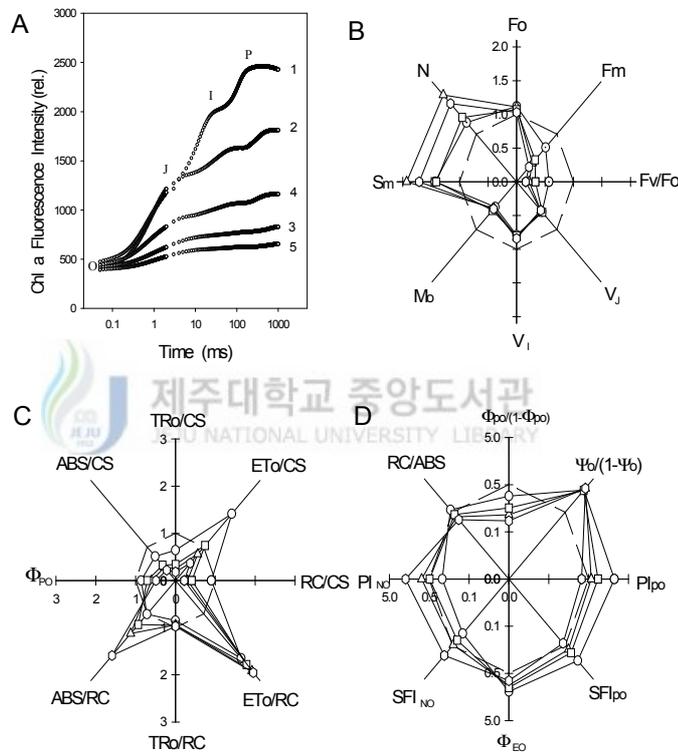


Figure 3-4. Seasonal variations of fluorescence transients O-J-I-P and spider plots of selected parameters quantifying the behaviour of PSII from leaves of 4 tropical/subtropical plant species. (A) fluorescence transients O-J-I-P, (B) Extracted and technical fluorescence parameters, (C) Quantum efficiencies, activities per reaction centre (RC) or effective absorption cross section, (D) Vitality indexes (structure-function and performance indexes). Abbreviations used are:

Φ_{po} , the maximum quantum yield of primary photochemistry; ABS/RC, TRo/RC, ETo/RC, are the specific energy fluxes (activities per reaction centre) for absorption, trapping and electron transport, respectively; ABS/CS, TRo/CS, ETo/CS, are the phenomenological fluxes for absorption, trapping and electron transport, respectively; RC/CS, number of active reaction centre per cross section. 1, summer (long dash); 2, early December (circle); 3, late December (triangle); 4, mid-January (square); 5, early February (hexagon).

달려 전자수용체 quinone이 완전히 환원상태에 있을 때의 형광을 의미하기 때문에 겨울철 저온에 의한 F_p 의 감소로 식물이 스트레스 상태에 놓여 있음을 간접적으로 알 수 있는데, 이로부터 겨울철에 F_v/F_m 값의 점차적인 감소가 예상된다. O-J-I-P 곡선 분석을 통해 산출된 형광변수들 중에서 F_m 과 F_v/F_o 가 겨울철 저온에 의해 점차적인 감소와 S_m , N 의 뚜렷한 증가가 관찰되었다 (Fig. 3-4B). 그리고, 엽면적 당 광계II활성을 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/RC는 크게 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-4C). 그리고 활력도를 나타내는 변수 중에서는 여름철에 비해 $\Phi_{po}/(1-\Phi_{po})$ 의 감소가 특징적이었다 (Fig. 3-4D).

4. 엽록소형광의 계절적 변화

자생지에서의 엽록소형광은 여름철 (7~8월)과 겨울철 (12월, 1~2월)의 새벽 (06:00)에 측정하여 온도변화가 광합성효율에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 3-5). 그 결과, 문주란 잎의 광계II의 광화학적 효율, 즉 F_v/F_m 은 여름철에 비해 겨울철에 낮게 나타났으며, 기온의 변화에 따라 현저하게 차이를 보였다. 일반적으로 F_v/F_m 값이 0.8보다 낮을 때는 광계II의 반응중심이 손상을 입은 상태이거나 비가역적인 불활성상태에 처해있는 상태라고 볼 수 있다 (Bolhar-Nordenkamp *et al.*, 1989). 여름철에 문주란 잎의 F_v/F_m 이 0.84의 값을 보여, 대부분의 건강한 식물에서 스트레스를 받지않는 정상적인

조건에서 식물 잎이 갖는 범위 (0.80~0.85)를 나타내었다 (Demming & Björkman, 1987). 그러나 겨울철에는 12월 초에 0.73의 값을 보였고 중순에 0.51, 1월 중순에 0.61, 그리고 2월 초에 0.41의 값을 보여 겨울철 온도변화 추이와 유사한 경향을 나타내어 저온이 광합성효율에 영향을 미침을 알 수 있다.

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

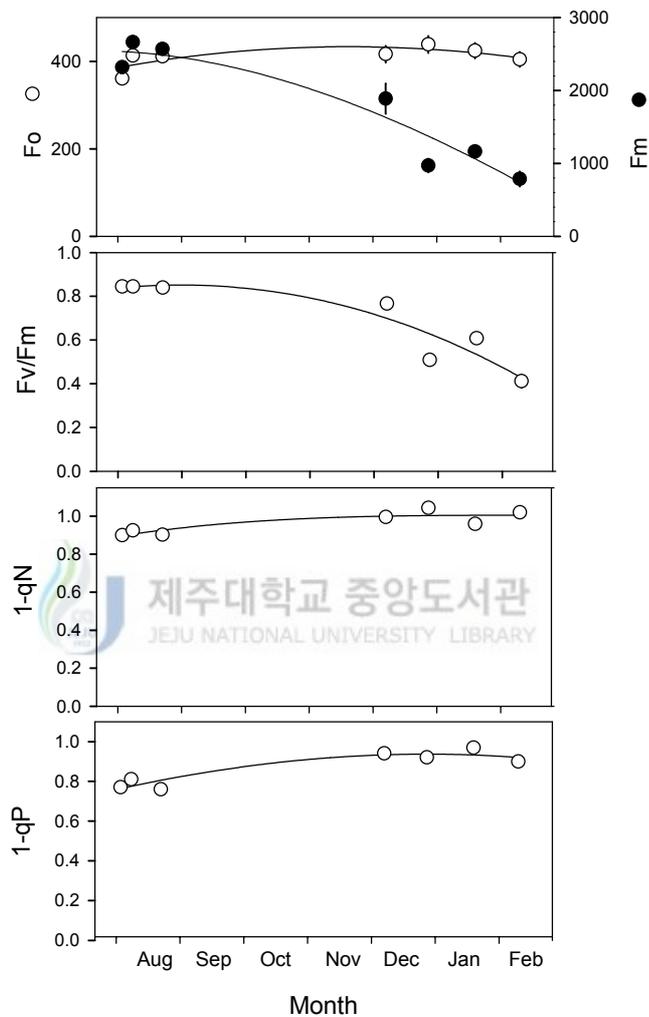


Figure 3-5. Seasonal variations of chlorophyll fluorescence parameters (F_o , F_m , F_v/F_m , $1-q_N$ and $1-q_P$) from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*. Chlorophyll fluorescence was measured at dawn (06:00), and the values represent the averages \pm SE of 20 independent measurements.

이차적인 현상은 임계온도 이하에 노출된 이후 시간의 경과와 함께 증가하거나, 처음 임계온도에 노출되었을 당시에는 영향이 없다가 시간의 경과 시 스트레스가 누적되어 나타나는 현상이다. 겨울철 문주란의 잎에서 볼 수 있는 광합성효율의 변화는 이 두 현상을 포함하고 있다. 즉, 저온에 민감한 식물들은 10°C 미만의 온도에 노출되면 우선적으로 광합성 과정이 먼저 영향을 받게 되는데, 초겨울에 F_v/F_m 값이 0.8 이하로 낮아져 저온에 의해 광계 II의 반응중심이 손상을 입거나 스트레스 조건에 처해 있음을 간접적으로 알 수 있다. 그리고 12월말부터 늦겨울에 이르기까지 F_v/F_m 값이 점차적으로 감소하여 0.5 이하로 낮아지는데, 이는 시간이 경과함에 따라 식물체에 가해지는 스트레스의 누적된 결과로 해석할 수 있다. 저온감수성 식물종들이 저온 (0~10°C)에 노출되었을 때 광합성효율이 현저하게 감소한다. 즉, 저온내성 식물인 호밀과 완두, 그리고 저온감수성 식물인 옥수수과 오이를 암상태의 저온에서 배양했을 때 저온내성 식물에서는 온도가 낮아져도 F_v/F_m 의 변화가 없지만, 저온감수성 식물에서는 종에 따라 다소의 차이는 있지만 온도가 낮아짐에 따라 F_v/F_m 값이 낮아졌다 (Feierabend *et al.*, 1992). 이처럼 저온감수성 식물종에서 저온에 의한 광합성효율의 억제는 빛이 처리되지 않은 완전한 암상태에서도 나타난다. 더군다나, 저온과 더불어 빛이 가해졌을 때는 광합성 기구의 불활성화는 더 증가하게 된다. 하지만 저온과 함께 빛이 가해졌을 때 광합성의 불활성화는 저온감수성 식물 뿐 만이 아니라 저온내성 식물에서도 나타난다 (Feierabend *et al.*, 1992). 문주란은 겨울철 새벽에 F_v/F_m 값이 감소하였으므로 저온감수성 식물과 유사한 경향을 보인다고 할 수 있다. 그리고 이러한 겨울철의 F_v/F_m 의 변화는 F_m 의 감소와 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 즉, F_o 값은 다소 증가하기는 했으나 큰 변화를 보이지 않는데 반해, F_m 값은 온도가 저하됨에 따라 급격하게 낮아져 겨울철 온도 저하에 의한 F_v/F_m 값이 저하를 유도한 것으로 보인다. 이와 같은 겨울철 문주란의 광합성효율의 저하는 F_o 의 미약한 증가와 F_m 의 감소를 수반하고 있어 광하에서의 만성적인 광억제와 유사한 결과를 보여주고 있다. 그리고 F_m 의 감소와 관련된 F_o 의 증가는 광수확복합체 (LHC; light harvesting complex)와 광계 II 엽록소의 에너지 분배에 영향을 미치며, 반응중심을 포함

한 모든 엽록소분자들의 빛 흡수용량을 감소시킨다 (Flagella *et al.*, 1994).

비광화학적 형광소멸과 광화학적 형광소멸과 관련이 있는 $1-qN$ 과 $1-qP$ 의 계절적 변화를 살펴보았다. 먼저 $1-qN$ 의 값은 여름철보다 겨울철에 다소 높게 유지되었다. 즉, 여름철 문주란의 $1-qN$ 은 0.90~0.92의 값을 나타내었고, 겨울철에도 0.96~1.0의 높은 값을 보였다. 여름철과 겨울철 새벽에 비광화학적으로 소멸되는 형광이 적음을 알 수 있다. 그러나 이러한 결과는 qN 이 강한 빛에 대한 광계 II의 보호능력을 의미하는 것이므로 (Demmig-Adams and Adams, 1992; Russel *et al.*, 1995), 여름철과 겨울철에 빛이 가해졌을 때의 반응을 살펴볼 필요가 있다. 그리고 $1-qP$ 는 여름철에 0.76~0.80의 범위를 나타내었고, 겨울철에는 0.90~0.97의 범위를 보여 온도가 낮은 겨울철이 여름철에 비해 다소 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 온도가 점차적으로 낮아질 때 $1-qP$ 가 증가한다는 Sonoike (1999)의 결과와 유사하며, 겨울철에 광계 II 반응중심들이 상대적으로 환원되어 있음을 의미한다. 광계 II의 초기 전자수용체인 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 일어날 수 있는 가능성은 낮아지지만, Q_A 가 환원 상태로 존재한다면 광손상이 일어날 가능성이 상당히 높아지게 된다 (Huner *et al.*, 1996). 따라서 문주란은 여름철에 비해 겨울철에 광계 II 반응중심들이 상대적으로 환원되어 있기 때문에 빛이 가해진다면 광손상이 일어날 수 있다. 이는 문주란 잎의 F_v/F_m 값이 겨울철이 여름철에 비해 낮으며, 겨울철 기온의 변화와 관련하여 현저하게 감소하는 것으로 겨울철 환경요인의 변화에 의해 식물체가 스트레스를 받고 있음을 나타내 주고 있다.

4. 요 약

문주란 (*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)을 대상으로 겨울철 저온에 의한 식물의 생리적 상태를 진단할 수 있는 지표를 제시하고자, 항산화효소의 활성, 엽록소형광과 O-J-I-P 패턴의 변화를 조사하였다. 항산화효소는 겨울철 저온의 누적에 의해 SOD 활성이 다소 증가하였으며, peroxidase 활성이 여름철에 비해 높고 특이적으로 검출되는 isoenzyme들도 관찰할 수 있었다. 하지만 catalase 활성이 낮은 것으로 보아 저온에 의해 생성된 활성산소를 효율적으로 제거하지 못하는 것으로 보이며, 이로 인해 식물의 생육에 영향을 미치는 것으로 보인다. 그리고 겨울철 저온의 축적됨에 따라 J, I, P-단계에서의 형광세기가 현저하게 감소하였다. O-J-I-P 곡선 분석을 통해 산출된 형광변수들 Fm, Fv/Fo, ABS/CS와 TRo/CS, RC/CS, Φ_{PO} , $\Phi_{PO}/(1-\Phi_{PO})$ 가 겨울철 저온에 의해 점차 감소하였으며, Sm, N, ABS/RC는 뚜렷하게 증가하였다. 문주란 잎의 광계II의 광화학적 효율, 즉 Fv/Fm은 여름철에 0.84의 값을 보이는데 반해, 겨울철에는 온도변화 추이와 유사한 경향을 보여 12월 초에 0.73, 12월 중순에 0.51, 1월 중순에 0.61, 그리고 2월 초에 0.41의 값을 보여, 저온이 광합성효율에 영향을 미침을 알 수 있다. 이러한 겨울철의 Fv/Fm의 변화는 온도가 저하됨에 따라 Fm값이 급격하게 낮아진 때문으로 보인다.

IV. 문주란의 항산화효소와 엽록소형광의 겨울철 일주기적 변화

1. 서 론

열대 및 아열대성 식물들이 온대지방에서 생육하는 경우에 저온장해가 문제시되고 있다. 저온장해 (**chilling injury**)란 식물의 적온 이하 빙점 이상의 온도 범위에서 생육할 경우에 일어나는 생장의 정지를 비롯한 각종 생육장해를 총칭하는 것으로 식물의 지리적 분포와 생존 (생육, 번식 등), 그리고 생산량의 감소에 직결되는 중요한 환경인자로 작용한다. 식물은 저온에 대한 적응도에 따라서 저온감수성, 저온저항성, 그리고 동결저항성 식물체로 구분할 수 있다. 저온에 가장 민감하게 반응하는 식물들은 열대 및 아열대 식물들로서 10℃ 미만의 온도에 노출되면 대사작용에 이상이 유발되며 수시간 또는 수일 내에 식물체에 심각한 파괴 또는 사멸이 초래되기도 한다 (Allen and Ort, 2001). 제주도는 다수의 열대 또는 아열대성 식물이 분포하고 있는 북한계선에 해당한다. 그러나 Fig. 1-2에서 보는 바와 같이 기온, 강수량, 광량 등 계절적 변화가 뚜렷하기 때문에 겨울철 동안의 온도변화에 의해 식물의 생육이나 대사에 영향을 미칠 수 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, 틸라코이드막 지질 및 단백질 조성의 변화 등을 수반하여 일어난다 (Powles, 1984; Öquist *et al.*, 1987). 더군다나, 저온과 더불어 과도한 빛에 노출되면 광억제 현상이 일어난다. 광억제 현상은 광계II 손상의 수선율이 광피해율을 보상하지 못할 때 일어나는 것으로 약한 광량에서도 다른 요인이 수선기구를 제한할 경우에는 광억제가 일어난다 (Tyystjarvi *et al.*, 1992; Somersalo and Krause, 1990). 따라서, 광계II의 광합성 효율은 여러 가지 환경요인의

영향을 연구하는데 이용할 수 있다. 더군다나 Table 2-1, 2-2에서 아열대성 식물 4종의 O-J-I-P 패턴으로부터 산출된 다양한 형광변수들이 스트레스의 지표로 활용이 가능할 것으로 제시한 바 있다.

따라서 본 연구는 환경요인의 변화, 특히 겨울철 저온에 의한 아열대성 식물의 반응기구를 규명하고 환경스트레스에 대한 식물의 반응을 정량화하고자, 저온감수성 식물인 문주란을 대상으로 수종의 향산화효소의 활성변화를 비교·분석하고, 엽록소형광과 O-J-I-P 패턴의 변화, 그리고 D1 단백질과 psbA 유전자의 발현양상을 조사하였다.



2. 재료 및 방법

1. 연구재료

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

2. 환경요인 조사

환경요인으로는 엽록소형광 측정 당시의 온도, 상대습도, 광량을 조사하였으며, 측정 방법은 2장에 기술한 방법과 동일하다.

3. 항산화효소의 활성분석

항산화효소는 SOD, peroxidase, catalase, APX의 활성과 isoenzyme 패턴을 전기영동을 통해 살펴보았으며, 조효소액의 제조, 전기영동, 효소의 선별염색은 2장에서 기술한 방법으로 실시하였다.

4. 엽록소형광의 측정 및 분석

4.1. O-J-I-P 분석

O-J-I-P (polyphasic rise of Chl a fluorescence transients) 패턴은 Strasser와 Strasser (1995)의 방법에 따라 2장에 제시한 방법으로 Plant Efficiency Analyzer (PEA; Hansatech Instrument Ltd., UK)를 이용하여 측정하였다.

4.2. 엽록소형광 측정

엽록소형광은 PEA를 이용하여 측정하였으며, 15분간 광을 차단하여 암 적응시킨 후 1초 간격으로 2회 연속 측정하였다. 2장에 제시한 방법을 사용하여 측정시에는 1,500 $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 광량을 1초간 조사하고 측정 사이에

는 $150 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 낮은 광량을 10초 간 조사하였다 (오 등, 2001). 엽록소형광측정은 06:00부터 20:00까지 2시간 간격으로 측정하였으며, 매 측정마다 20회 반복으로 측정하여 분석하였다.

5. D1 단백질의 발현양상 분석

5.1. 항체제조

D1 단백질의 항체를 제조하기 위한 항원은 옥수수 (*Zea mays*) D1 단백질의 DE loop에 있는 236~247번째의 아미노산서열 GYKFGQEEETYN을 Peptron사 (대전)에 의뢰하여 합성하고 KLH (Hemocyanin-agarose from keyhole limpet)단백질과 conjugation시켜 사용하였다. 항원단백질은 Freund's complete adjuvant를 첨가하여 현탁시킨 후 토끼의 피하조직에 주사하였다. 10일 후에 Freund's incomplete adjuvant를 첨가하여 현탁시킨 용액을 열흘 간격으로 3회 주사하여 boosting시켰다. 최종적으로 boosting injection시킨 10일 이후에 혈액을 취하여 4°C에서 하룻밤 동안 정치시킨 후, 4°C에서 $2,500 \times \text{g}$ 로 30분간 원심분리하여 취한 상청액을 -20°C에 보관하고 D1 단백질의 항체로 사용하였다.

5.2. 단백질의 추출

식물체의 잎을 1.0 g 씩 취하여 0.1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0; 25 μM PVP, 5 mM ascorbic acid, 0.1 M β -mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 함유) 5 ml와 함께 얼음 위의 유발에서 마쇄한 후, 4°C 하에서 8,000 g로 30분간 원심분리하여 얻은 상청액을 단백질 분석의 시료로 사용하였다.

5.3. SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide 겔 전기영동은 Laemmli (1970)의 방법을 따랐다. 전기영동 시료는 효소액을 동량의 시료용 완충용액 (125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 0.005% bromophenol blue, 50% sucrose, 5% β -mercaptoethanol, 10% SDS)과 혼합하여 끓는 물에서 10분

간 중탕하여 단백질을 변성시켰다. 변성시킨 단백질 시료는 10% SDS-polyacrylamide running gel과 3% stacking gel로 구성된 vertical slab gel에 loading하여, stacking gel에서는 50V, running gel에서는 100V로 전기영동하였다.

5.4. Western blot 분석

Western blotting은 Towbin 등 (1979)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, SDS-전기영동이 끝난 gel slab에 nitrocellulose 필터를 얹어 플라스틱 grid로 고정시킨 후 electroblotting kit에 넣고 400 mA의 전류를 흐르게 하여 5시간 동안 electroblotting을 실시하였다. Electroblotting이 끝난 후 nitrocellulose 필터를 조심스럽게 들어내어 TBS (Tris-buffered saline)로 10분간 씻고 0.05% bovine serum albumin (BSA)를 포함하는 TBS로 30분간 blocking시켰다. 그 다음 1000배 희석된 항체용액에서 1시간 동안 넣어 항체를 부착시키고, 다시 2000배 희석한 anti-immunoglobulin G용액에서 1시간 동안 넣어 2차 항체를 부착시켰다. 2차항체를 부착시킨 nitrocellulose 필터는 염색액 (2.5 mg 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.03% H₂O₂가 들어있는 TBS)에 담가 어두운 곳에서 발색시켰다. 발색이 충분히 이루어지면 꺼내어 흐르는 물에 씻고 여과지에 얹어서 건조시켰다.

6. psbA 유전자의 발현양상 분석

6.1. Total DNA 분리

Total DNA는 Murray와 Thompson (1980)의 방법을 변형한 Dellaporta 등 (1983)의 방법으로 추출하였다. 신선한 상태의 문주란 어린 잎 1 g에 액체질소를 가하여 분말로 곱게 마쇄하고, 0.1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0; 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 2% SDS, 1% PVP, 0.1% β-mercaptoethanol 함유) 10 ml를 첨가하여 60°C에서 30분간 진탕하였다. 진탕액에 동량의 phenol-chloroform (1:1) 용액을 첨가하여 단백질을 제거하고, 5 M potassium acetate (pH 6.5)를 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침

전물을 TE 완충용액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)으로 용해 시키고, RNase A와 proteinase K (Sigma, USA)를 사용하여 남아있는 RNA와 단백질을 분해하였다. 분해된 RNA와 단백질 등은 0.5 M Tris (pH 8.0)로 포화시킨 phenol-chloroform (1:1) 용액을 처리하여 제거하였다. 최종적으로 정제된 DNA는 70% 에탄올로 세척한 후 TE 완충용액에 녹이고 정제된 DNA의 양과 질을 결정하기 위해 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 A260과 A280에서 OD값을 측정하였다.

6.2. PCR probe 제작

psbA (gene bank X15901)와 16S rRNA (gene bank 11957)로부터 PCR primer를 design 하였다. psbA의 forward primer는 5'-gaaaaccgtctttacattgga-3', reverse primer는 5'-agttgtgagcattacgttcat-3'로 사용하였다. 16S rRNA forward primer는 5'-tctcatggagagttcgatcct-3', reverse primer는 5'-ctttgtcccgccattgtagc-3'를 사용하였으며, 예상되는 primer pair의 PCR product size는 psbA = 942bp, 16S rRNA = 1200bp이다.

문주란의 total DNA를 template로 하고 PCR를 수행하였다. PCR 반응은 template DNA 10 ng, 0.4 μ M primer, 0.2 mM dNTP, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 등이 포함되도록 하여 총 반응용액을 20 μ l가 되게 하였다. PCR 반응은 94°C에서 2분간 예열한 후, 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분으로 이어지는 과정을 30회 반복수행하였다. 모든 DNA 증폭은 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer cor., USA)을 사용하여 실시하였다.

증폭여부를 알아보기 위해 1% agarose gel에서 전기영동하여 target sequence의 증폭여부를 확인하고, 증폭된 PCR products만을 gene clean kit (QIAGEN)를 이용하여 추출하였다. psbA와 16S rRNA probe는 Dig-DNA labelling system (Boehringer Mannheim Biochemica)의 사용지침에 따라 수행하였다.

6.3. Total RNA 분리

Total RNA 분리는 Danyluk와 Sarhan (1990)의 방법을 변형하여 실시하였으며, RNA양은 260 nm의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 즉, 문주란 잎 1.0 g에 액체질소를 가하여 분말로 곱게 마쇄한 다음 여기에 미리 80℃에서 진탕한 RNA extraction buffer (4 M lithium chloride, 1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 20% SDS, pH 8.0)와 동량의 phenol을 첨가하여 잘 섞어주었다. 그 후 동량의 chloroform-isoamylalcohol (24:1)용액을 첨가하여 단백질을 제거하고, 4℃에서 12,000 rpm의 속도로 15분간 원심분리하고 그 상층액을 분리하였다. 그리고 이 과정을 한번 더 반복하였다. 여기에 동량의 4 M lithium chloride를 넣어 잘 섞은 다음 -70℃에서 2시간 보관한다. 그리고 이것을 4℃에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 그 후 pellet은 70% 에탄올을 이용하여 3차례 washing한 후 진공건조 하여 에탄올을 완전히 제거한다. 그리고 적당량의 DEPC water에 녹인 후 3M sodium acetate (pH 5.2)와 95% 에탄올을 넣어 잘 섞은 다음 -70℃에서 1시간 이상 보관한다. 그리고 이것을 4℃에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 그 후 pellet을 진공 건조시킨 후 DEPC water에 녹여 -70℃에서 보관하면서 사용하였다.

6.4. Northern blot 분석

분리한 total RNA는 formamide와 formaldehyde 용액을 첨가하여 65℃에서 15분간 두어 RNA를 변성시킨 후 loading buffer (50% glycerol, 1 mM EDTA, 0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanole)을 넣어 혼합하여 1.2% formaldehyde-denaturing agarose gel을 사용하여 1× MEA 완충액 (20 mM MOPS, 8 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 사용하여 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 agarose겔은 DEPC 처리된 멸균수를 사용하여 수차례 세척하여 formaldehyde를 제거한 후 Sambrook 등 (1989)의 방법에 따라 10× SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0)를 사용하여 capillary blotting을 수행하여 RNA를 (+)-전하를 띄고 있는 nylon막으로 전이시켰다. Blotting이 끝난 nylon막은 UV-cross-linker

로 cross-linking시켰다. 혼성화반응은 Sambrook 등 (1989)의 방법에 따라 100 cm²당 10 ml의 전혼성화용액 (6× SSC, 5× Denhardt용액, 0.5% SDS, 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA)이 들어있는 비닐백에 nylon막을 넣어 65℃에서 4시간 동안 전혼성화시킨다. 혼성화반응은 동일한 조성의 혼성화용액에 DIG labeling (DIG-DNA labeling and detection kit, Boehringer Mannheim)된 psbA 유전자나 16S rRNA의 probe를 사용하여 혼성화반응을 수행하였다.



3. 결과 및 고찰

1. 환경요인의 일변화

조사지역의 겨울철 온도, 상대습도, 광량의 일변화를 조사하여 여름철의 것과 비교하였다 (Fig. 4-1). 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 모두 12시에 가장 높게 나타났다. 측정일에 따라 차이가 있지만 겨울철에는 낮시간 (10:00~14:00)에 대략 300~600 $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 로 나타나 8월초 낮시간의 750 $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ 에 비해 낮아졌다. 온도는 광량이 많은 낮시간에 다소 높아지는데, 새벽과 밤에는 하강하여 일교차가 큰 것으로 나타났다. 12월초와 1월중순에 새벽에서 밤에 이르기까지 전반적으로 10°C 이상의 온도를 보였으며, 낮시간에 각각 최고 온도인 18.2°C와 22.5°C로 나타났다. 8월초 일평균온도가 25°C 이상을 유지하고 있어 겨울철 온도가 크게 감소하였음을 알 수 있다. 그리고 12월말에 온도의 변화는 새벽과 밤에 3°C 안팎의 온도를 유지하였고 광량이 증가에 따라 정오에 14°C로 증가하여 밤과 낮의 일교차가 10°C 이상으로 크게 나타났다. 2월초에도 낮시간에 온도가 상승하여 대략 10~15°C 범위를 나타내었고, 새벽과 밤에는 10°C 이내의 온도를 유지하였다. 겨울철의 상대습도는 전반적으로 높게 유지되었으나, 광량이 많은 낮시간에 낮아졌다가 밤에는 다시 증가하는 경향을 보였다. 따라서 문주란 자생지에서의 환경요인의 변화 중에 온도가 겨울철에 큰 폭으로 감소하였으며, 특히 12월말과 2월초에 10°C 이하의 온도에 노출되어 있어 열대 또는 아열대성 식물의 생장에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 이는 Figs. 2-8, 2-9에서 보는 바와 같이 4종의 아열대성 식물들의 Fv/Fm이 종에 따라 다소의 차이는 있으나 겨울철에 0.8 이하로 낮아져 겨울철 저온의 영향을 받고 있음을 제시한 바 있다. 특히, 문주란은 다른 3종에 비해 Fv/Fm이 0.5로 낮아져 저온에 민감한 것으로 보인다. 그리고, Fig. 3-5에서 보는 바와 같이 겨울철 Fv/Fm이 현저하게 감소하는 것은 저온의 누적에 의한 결과로 보인다. 그리고 Figs. 2-3, 2-4에서 문주란의 항산화효소 중 catalase 활성이 겨

울철에

감소하였으며,

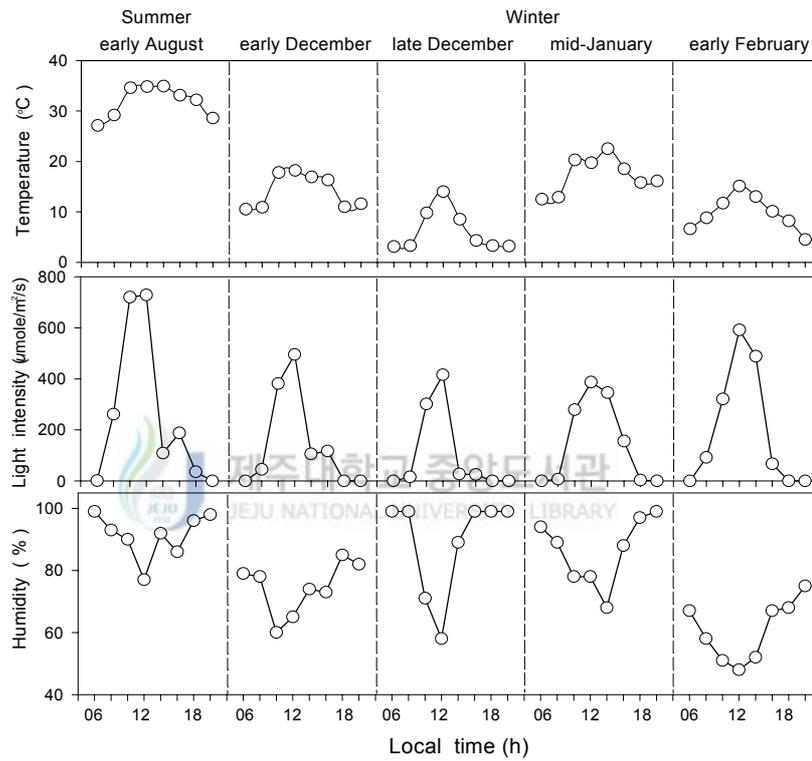


Figure 4-1. Diurnal variation of temperature, light density, and relative humidity, and on the natural habitat of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* in summer and winter. The values represent the averages of 10 independent measurements.

peroxidase 활성은 증가하여 환경 변화에 민감하게 반응하는 것으로 제시한 바 있다.

2. 항산화효소

제주지역에 자생하는 문주란은 겨울철에 오랜 시간 동안 저온에 노출되며, 일주기로 보았을 때는 새벽과 밤에 저온 (0~12℃) 또는 동결 (0℃ 이하의 온도) 조건에 노출된다. 저온감수성 식물체에 있어서 저온상해는 0~15℃ 사이에서 일어나는데 (Lyons, 1973; Wang, 1990), 이 온도 범위는 동결을 야기하지는 않지만 이들 식물들이 생산성을 상당히 감소될 수 있는 조건이다. 겨울철 저온이 문주란에 미치는 영향을 살펴보기 위해 12월초와 2월초에 문주란 잎의 항산화효소 isoenzyme 패턴을 조사하여 여름철 (8월초)의 것과 비교하였다 (Fig. 4-2).

SOD는 전체적으로 7개의 밴드가 관찰되었으며, 이들은 H₂O₂와 KCN에 의한 선택적 저해로부터 1개의 Mn-SOD와 6개의 CuZn-SOD로 구분할 수 있었다 (Fig. 4-2A). 각 조사시기의 일변화에 있어서 이들 isoenzyme의 효소활성은 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 12월초에는 새벽과 밤, 그리고 낮에 관계없이 여름철과 유사한 활성을 보이는데 반해, 2월초에는 Mn-SOD와 CuZn-SOD 4과 5의 활성이 낮에 증가하였다. 이러한 결과는 저온감수성 식물인 오이를 4℃ 저온에서 배양했을 때 SOD 활성이 증가하였으며 (Lee and Lee, 2000), 열대성 식물인 *Coleus blumei*을 10℃의 온도에서 2일간 배양하였을 때 SOD 활성이 증가하는 것과 유사하다 (Peltzer *et al.*, 2002). 그리고 Fig. 2-2에서 보는 바와 같이 박달목서의 SOD 활성이 겨울철에 증가하는 것으로 나타나 종에 따라 차이는 있으나 저온의 영향을 받고 있는 것으로 사료된다. 그리고 저온내성인 *Fagus sylvatica*를 10℃에서 배양했을 때 SOD를 포함한 항산화효소의 활성

이 암상태에서 보다 광하에서 감소하였다 (Peltzer *et al.*, 2002). 특히, 형질 전환된 담배 잎에서의 Mn-SOD와 엽록체 CuZn-SOD의 과발현은 빛이 존재할 때, paraquat에 의한 손상이나 저온과

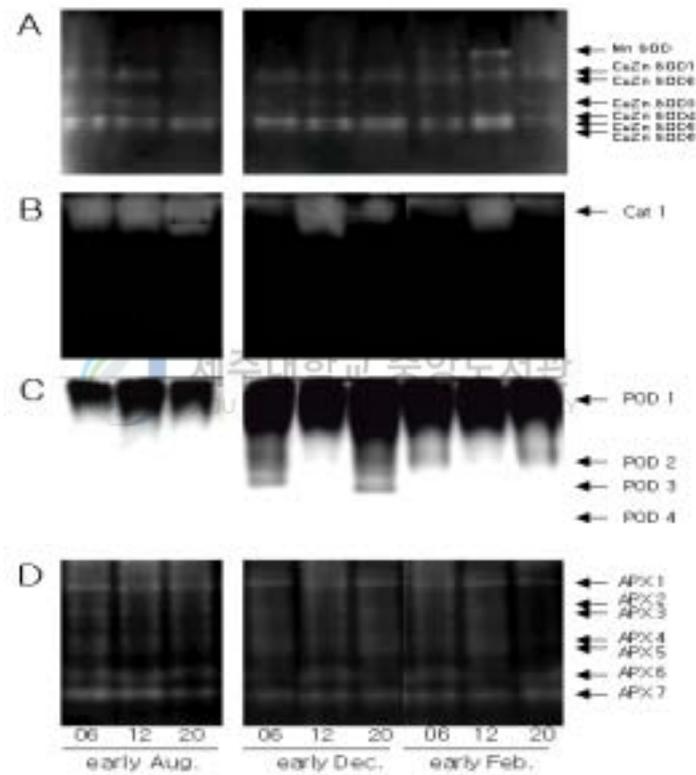


Figure 4-2. Diurnal changes of antioxidant enzyme activities of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* leaves, at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter. A, superoxide dismutas ; B, catalase; C, peroxidase; D, ascorbate peroxidase.

빛의 상승작용에 의한 손상으로부터의 방어작용을 한다고 보고한 바 있다 (Bowler *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1993). 본 연구에서도 늦은 겨울 낮시간에 Mn-SOD와 일부 CuZn-SOD 활성이 증가하여 저온의 반복적인 노출과 빛의 상승작용에 의해 식물이 스트레스를 받고 있음을 알 수 있다.

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. 4-2B). 저온감수성 식물인 옥수수과 오이는 암상태에서 온도의 저하에 의한 catalase 활성의 변화는 없으나, $520 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광하에서 온도가 낮아짐에 따라 catalase 활성은 점차적으로 감소하여 (Feierabend *et al.*, 1992), 본 연구의 결과와 다소 차이를 보인다. 하지만 $520 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광하에서 저온 처리 기간이 증가함에 따라 catalase의 활성이 처음에는 감소하였다가 다시 증가하는 것으로 나타나 저온감수성 식물이라고 하더라도 종에 따라 빛에 대한 민감도에 있어서 차이가 있는 것으로 사료된다.

Peroxidase는 전체적으로 4개의 밴드가 관찰되었으며 (Fig. 4-2C), 12월초에 높은 활성을 나타내었으나 2월초에 감소하는 경향을 보였으며, peroxidase 3과 4는 겨울철 초에만 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. 이러한 결과는 저온감수성 식물인 옥수수와 오이에서 15°C 이하의 저온에서 peroxidase 활성이 감소하는 현상과 유사하다 (Feierabend *et al.*, 1992). 하지만, 겨울철에 저온에 반복적으로 노출됨으로써 peroxidase 활성은 감소하였으나, 여름철에 비해서는 겨울철에 증가하였다. 따라서 12월 초의 온도가 10°C 이상의 범위를 보이고 있고, 초겨울의 Fv/Fm이 여름철에 비해 다소 낮아졌으나 0.73의 값을 나타내는 것

으로 보아 (Fig. 3-5), 초겨울의 기상이 문주란의 생육에 어느 정도 영향은 미치나 심각한 피해를 끼치지 않는 것으로 보이며 peroxidase 활성이 여름철에 비해 높은 것은 온도의 저하에 의한 적응의 과정으로 보인다. 그러나 2월초에는 10℃ 이하의 낮은 온도를 보일 뿐만 아니라 저온에 반복적으로 노출되어 Fv/Fm이 0.41의 값을 보이고 있어 (Fig. 3-5), peroxidase 활성의 감소는 저온에 의한 피해가 나타난 것으로 사료된다. APX는 전체적으로 8개의 밴드가 검출되었으며, 겨울철 초에는 새벽과 밤에 높은 활성을 보이고 겨울철 말에는 낮에 높은 활성을 보였다 (Fig. 4-2D).

항산화효소들은 각종 스트레스에 의해 과다하게 생성되는 활성산소종을 제거하는 기능을 가지고 있으며, 항산화효소 활성의 증가는 환경스트레스에 대한 식물의 내성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 겨울철 문주란에서 검출되는 이들 항산화효소의 일변화를 종합해 보면 전반적으로 겨울철 낮에 SOD와 catalase 활성이 높은 것으로 나타났다. 그리고 peroxidase는 새벽과 밤에 높은 활성을 보였으며 겨울철 초에만 특이적으로 검출되는 isoenzyme들로 관찰할 수 있었다. 이처럼 항산화효소의 변화로부터 문주란이 겨울철 환경요인의 변화에 의해 스트레스를 받고 있음을 알 수 있다. 그리고, 초겨울에는 특히 peroxidase 활성이 높고, 특이적으로 발현되는 isoenzyme들이 있어 저온 스트레스를 극복하기 위한 식물의 적응기구가 활발히 작용하는 것으로 생각되며, 늦은 겨울에는 SOD 활성이 초겨울보다 다소 높으나 다른 효소들의 활성이 낮아 저온 누적으로 인한 산화적 스트레스를 소거하기 위한 적응기구의 효율성이 떨어지는 것으로 보인다.

3. 엽록소형광의 일변화

3.1. 광합성효율의 일변화

겨울철의 엽록소형광의 일변화 양상을 조사하여 여름철의 것과 비교하였다 (Fig. 4-3). 겨울철 문주란 앞에서 엽록소형광의 일변화를 살펴보면, Fv/Fm은 밤과 낮에 관계없이 거의 일정한 값을 유지하고 측정 시기에 따라서는 그 값이 크게 변화하였다. 즉, 12월초에 0.72~0.77 범위의 값을 나타내었고, 12월말에는 0.39~0.51의 범위를, 1월중순에는 0.58~0.70의 범위를,

그리고 2월초에는 0.36~0.48 범위의 값을 나타내어 8월초 새벽과 밤에 문주란 잎의 F_v/F_m 이 0.83~0.85 값을 보이는 것에 비해 크게 감소하였다. 이는 겨울철에 온도의 감소와 저온의 반복적인 노출이 문주란 잎의 광합성효율에 영향을 미

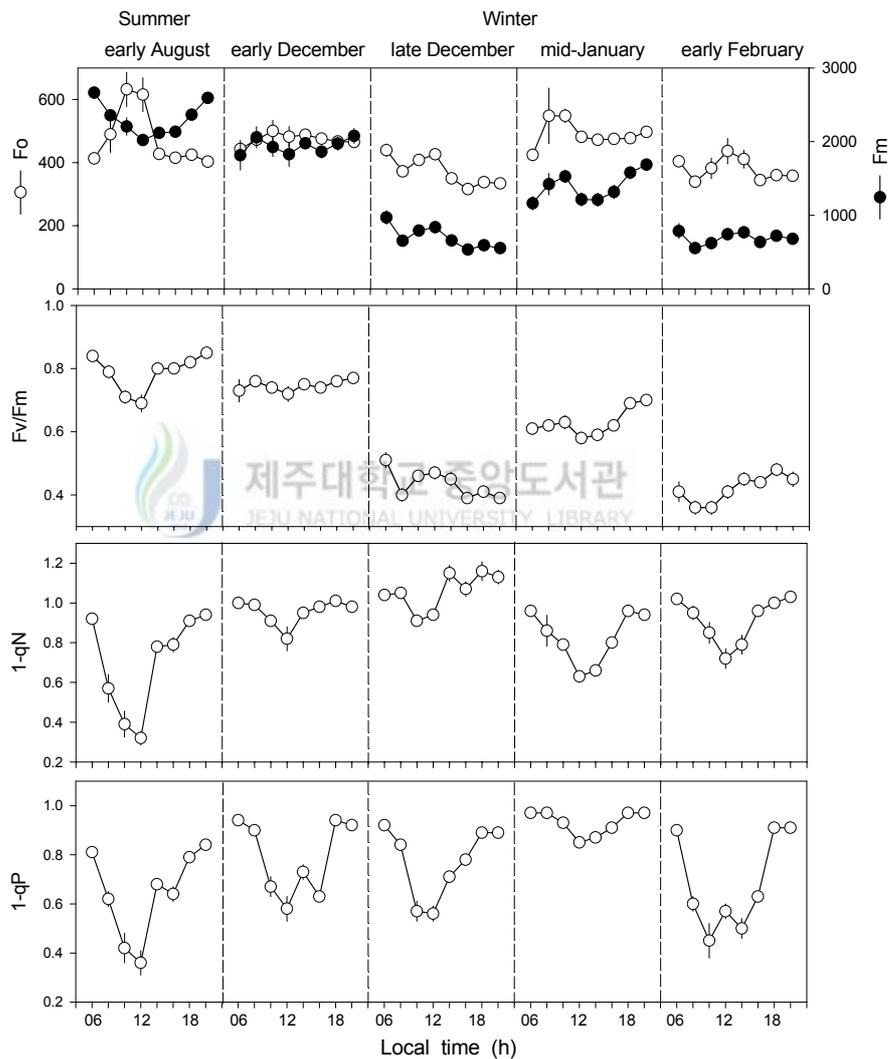


Figure 4-3. Diurnal variation of chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_m , $1-q_N$, $1-q_P$) from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* on the

natural habitat in winter. The values represent the averages \pm SE of 20 independent measurements.

치는 것으로 생각되며, Fig. 3-5에서 제시한 바 있다. 그리고 저온에 노출된 이후 스트레스 조건이 제거되었을 때, 즉 다시 온도가 증가하였을 때 문주란의 Fv/Fm값이 완전히 회복되는 것은 아니지만 다소 회복되는 양상을 볼 수 있다. 그리고 Fig. 3-1과 Fig. 4-1에서 보는 바와 같이 12월말에 온도가 급격히 낮아져 문주란 잎의 Fv/Fm값은 0.39~0.51 범위로 급격히 감소하였는데, 이는 Fm의 감소와 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 한편, 저온에 민감한 식물들의 잎이 저온과 함께 광에 노출되었을 때 광억제가 촉진되는 것으로 알려졌다 (Powles, 1984; Öquist *et al.*, 1987). 하지만, 본 실험에서는 문주란 잎의 겨울철 낮시간에 빛에 의한 Fv/Fm의 감소가 적었다. 이러한 결과는 8월초 낮시간에 문주란 잎의 Fv/Fm이 0.69로 낮아져 광억제를 받는 것보다 대조적이며, Fig. 2-8에서 살펴본 바와 같이 문주란은 여름철 낮시간의 높은 광량과 온도에 의해 만성적인 광억제 현상을 야기한다. 그러나 8월초 낮시간에 감소한 Fv/Fm은 태양광선이 감소하는 오후에 원래상태로 회복되는 것으로 보아 광계II 반응중심의 가역적인 불활성화에 기인한 결과로 해석되는데 반해 겨울철에는 저온에 의해 식물체가 손상을 받아 낮시간에 Fv/Fm의 감소가 적은 것으로 사료된다.

한편, 비광화학적 형광소멸, 그리고 광화학적 형광소멸과 관련이 있는 엽록소형광 변수인 1-qN과 1-qP의 일주기적 변화를 살펴보았다. 먼저 1-qN은 겨울철에는 측정시기에 상관없이 새벽과 밤에는 0.9 이상의 높은 값을 보이는데 반해, 낮시간에는 측정시기에 따라 차이는 있지만 조금 낮아져 대략 0.63~0.78 범위의 값을 보여, 과도하게 여기된 에너지를 열의 형태로 방출하여 저온과 광에 의해 광계II의 반응중심이 손상을 미약하게나마 완화시키는 것으로 보인다. 그러나 8월초 낮시간의 1-qN이 0.34인데 비해 겨울철 낮시간의 감소폭은 낮아 겨울철 환경 변화에 의해 문주란이 스트레스를 받고 있는 것으로 보인다. 한편, qN은 pH 구배 또는 에너지 의존성 소멸 (Δ pH or

energy dependent quenching; qE), 광계 II에서 광계 I 으로의 에너지 재분배에 의한 소멸 또는 상태 전이와 관련된 소멸 (state-transition quenching; qT), 그리고 광저해에 의한 소멸 (photoinhibitory quenching; qI)을 포함하고 있다 (Quick and Stitt, 1989; Walters and Horton, 1991). qN 을 구성하는 이들 요소들은 여러 스트레스에 의한 생리적 조건에 따라 다르게 나타나는데, 주로 qE 에 의한 영향을 많이 받는다(Briantais *et al.*, 1979). 그러나, 겨울철 문주란 앞에서는 열의 형태로 방출하는 에너지의 30~45%가 qE 이며 대부분은 qI 인 것으로 나타나, 겨울철 낮시간의 환경이 광손상을 야기하지만 느리고 지속적인 열의 방출을 통해 미약하게나마 광손상을 완하시키는 것으로 생각된다. 겨울철 $1-qP$ 는 새벽과 밤에는 여름철과 마찬가지로 0.9 이상의 높은 값을 보이는데 반해, 낮시간에 대략 0.50~0.60 범위로 낮아졌지만 여름철에 비해 그 감소폭은 적었다 즉, 여름철과 겨울철 새벽과 밤에는 $1-qP$ 의 값이 높게 유지되어 Q_A 와 Q_B 의 산화가 억제되며, 광계 II의 반응중심이 닫혀있는 상태를 반영한다고 할 수 있다. Q_A 와 Q_B 의 산화가 억제된다는 것은 CO_2 고정반응이 억제되어 ATP와 NADPH가 축적되므로 퀴논 이후로 전자전달이 억제되어 Q_A 와 Q_B 가 환원상태로 유지된다는 것을 나타낸다. 이에 반해 낮시간에는 상대적으로 Q_A 와 Q_B 의 산화환원상태가 균형을 이루고 있어 환원상태의 Q_A 또는 Q_B 가 재산화되면서 다음 단계로의 전자전달이 이루어지고 있음을 의미한다. 하지만 그 비는 겨울철이 낮은 것으로 나타났다.

3.2. *psbA*와 D1 패턴

광억제는 광손상 속도가 복구능력보다 빠를 때 언제든지 일어날 수 있으며, 이들 두 과정 사이의 상호작용에 따라 광합성 기구의 효율성이 결정된다. 일반적으로 빛의 양이 식물의 수용능력보다 많을 때 광합성 기구에 손상을 미쳐 광계 II의 광화학적 효율인 F_v/F_m 값이 감소하게 되는 광억제 현상이 나타난다 (Powles *et al.*, 1984; Long *et al.*, 1994). 이러한 광억제 현상은 여러 가지 요인으로 기인할 수 있는데 대표적인 예로 엽록체 구조의 붕괴, 광합성 반응중심 간의 여기에너지 전이효율의 변화, 광합성 색소의 파괴 등을

들 수 있다. 광계Ⅱ가 광합성을 저하의 주된 기관으로 주목되면서 32 kDa의 분자량을 나타내는 D1 단백질의 파괴와 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다. 따라서, D1 단백질과 이를 암호화하고 있는 *psbA* 유전자의 일변화를 조사하였다 (Fig. 4-4). 그 결과, 초겨울에는 8월초의 일변화와 마찬가지로 새벽과 밤 시간에 D1 단백질이 많이 발현되고 낮시간에는 적게 발현되었다. 그리고 *psbA*

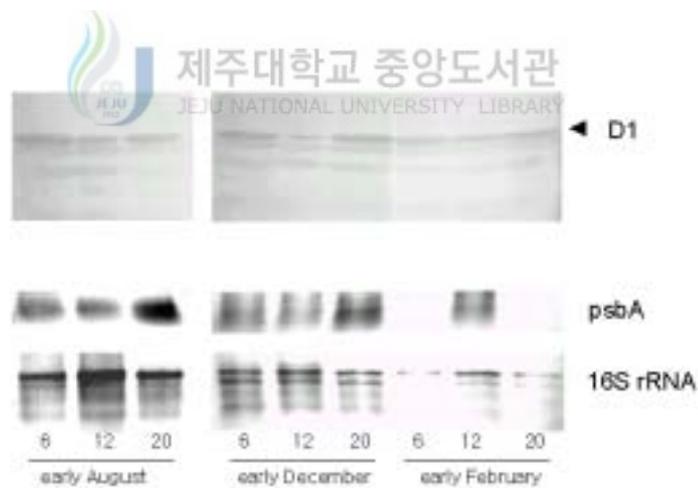


Figure 4-4. Immunoblot of D1 protein of PSII and RNA gel blot of *psbA* and 16S rRNA genes from *Crinum asiaticum* var. *japonicum* leaves, at dawn (06:00), mid-day (12:00) and night (20:00) in summer and winter.

전사체도 낮시간보다는 새벽과 밤에 더 많이 발현되는 것으로 나타나 **D1** 단백질의 발현패턴과 유사한 결과를 보였으며, **16S rRNA** 전사체는 정상적으로 발현이 이루어졌다. 초겨울 낮시간의 **D1** 단백질의 감소는 낮시간의 단백질합성 과정의 이상 또는 단백질분해가 더 활발하게 일어나는 데서 기인한 것으로 해석해 볼 수 있다. 늦은 겨울에는 초겨울에 비해 **D1** 단백질이 많이 감소하였으며, 일변화에 있어서는 낮시간에 발현 정도가 다소 낮았다. 그런데, **psbA** 전사체와 **16S rRNA** 전사체는 낮시간에 오히려 더 많이 발현되는 것으로 나타났다. 이로부터 늦은 겨울 낮시간의 **D1** 단백질의 감소는 낮시간의 단백질합성 과정의 이상에 기인한 것으로 해석해 볼 수 있다. 한편, 초겨울과 늦은 겨울 모두 새벽과 밤 시간에 **D1** 단백질이 많고 낮시간에 적은 양상은 겨울철 낮시간에 광계II 활성이 억제될 수 있음을 나타내주고 있다. 하지만, **Fig. 4-3**에서 보는 바와 같이 초겨울이나 늦은 겨울 낮시간에 **Fv/Fm**의 억제가 뚜렷하게 나타나지 않고 있다. 이와 같은 **D1** 단백질과 광계II 활성의 불일치로부터 겨울철에 새벽과 밤 시간에 문주란의 잎에 존재하는 **D1** 단백질의 상당량은 불활성 상태로 존재하며 저온으로 인한 단백질분해 활성이 낮은 데서 기인한 것으로 해석된다. 식물이 저온과 더불어 강한 광에 노출되면 광계II 반응중심의 **D1** 단백질이 인산화에 의해 불활성화되어 분해됨으로써 광계II의 불활성화를 유도한다. 광계II의 최대효율인 **Fv/Fm**은 **D1** 단백질의 분해와 상호관계가 있는 변수로 알려져 있다 (Ritamaki *et al.*, 1994). 그리고 겨울철 낮시간에 **protease**의 활성이 증가하는데 **D1** 단백질의 분해가 낮시간에 증가한 **protease**의 작용에 기인한 것이 아닌가 생각된다. 하지만 늦은 겨울에는 **D1** 단백질의 감소는 물론 **Fv/Fm**도 감소하고 있어 저온에 의한

Fv/Fm은 D1 단백질의 분해와 상호관계가 있는 것으로 사료된다.

4. O-J-I-P 분석

문주란 잎의 광합성장치의 행동의 일변화를 O-J-I-P 곡선으로 나타내었다 (Fig. 4-5). 그 결과, 겨울철 J, I, P-단계에서의 형광세기가 8월초에 비해 현저하게 감소하였으며, 이는 Fig. 3-4에서 확인할 수 있었다. 그리고 각각의 측정시기에 있어서 새벽과 밤의 O-J-I-P 곡선은 거의 유사한 패턴을 보이는데



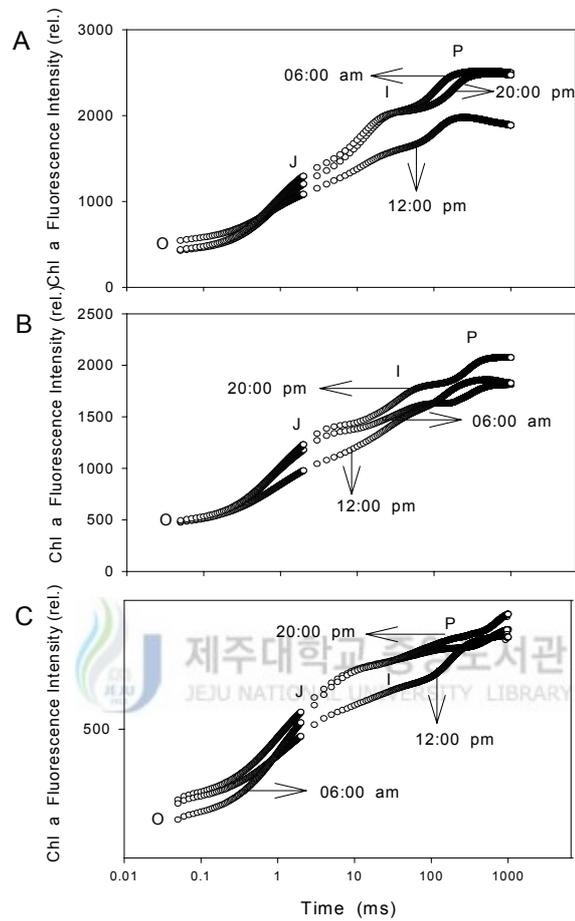


Figure 4-5. Diurnal changes of fluorescence transients O-J-I-P from leaves of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* on the natural habitat in summer and winter. (A) early August, (B) early December, (C) early February

반해, 낮에는 전반적으로 낮아졌으며, 특히 J-단계와 I-단계의 감소는 8월초와 겨울철에 공통적인 현상으로 나타났다. 초겨울 문주란 잎의 O-J-I-P 곡선을 분석하여 광계II의 전자수용체의 연속적인 환원과정을 비교해 보면 (Fig. 4-5B), P-단계에서의 엽록소형광세기는 새벽이나 밤, 낮에 관계없이 높게 유지되었는데, 새벽과 밤의 형광세기가 늦은 겨울에 비해 대략 3배 더 높았다. 특히 새벽과 밤의 초기유도곡선은 거의 유사한 패턴을 나타내었다. 낮의 초기유도곡선은 새벽과 밤의 초기유도곡선과는 조금 차이를 보였다. 먼저 O-J구간의 초기 기울기가 낮에 조금 낮아졌다. 이는 겨울철 새벽과 밤에 비해 낮시간에 환원상태의 Q_A (즉, Q_A^-)가 Q_B 로의 전자 전달이 원활하게 이루어지고 있지 않음을 의미하며, 이러한 결과는 Fig. 4-3에서 살펴본 바와 같이 낮시간에 $1-qP$ 의 감소로 알 수 있다. 그리고 J-I구간의 변화는 적었으며, I-P구간의 변화는 유사하였다. 늦은 겨울에는 F_0 의 값과 P-단계에서의 엽록소형광 세기가 겨울철 초에 비해 크게 감소하였다 (Fig. 4-5C). 새벽과 밤의 초기유도곡선은 겨울철 초와 마찬가지로 거의 유사한 패턴을 나타내었으며, 낮의 초기유도곡선은 새벽과 밤의 초기유도곡선과는 조금 차이를 보였으며, F_0 의 값은 낮에 조금 증가하였다.

Fig. 4-5의 O-J-I-P 곡선에서 산출된 주요 변수들을 제시하였다 (Table 4-1). 우선, 겨울철 문주란 잎의 F_m 값은 여름철에 비해 상당히 낮으며, 겨울철 저온의 반복적인 노출에 의해 그 값은 큰 폭으로 감소하였다. 이는 겨울철 저온에 의해 문주란 잎이 스트레스를 받고 있음을 의미하며, 잎 단위면적 당 (엽면적 당; CS) 광계II 안테나에 산화상태의 엽록소분자들이 적어서 나타나는 결과로 해석할 수 있다. 그리고 F_v/F_0 값도 저온의 반복적인 노출에 의해 감소하였다. 그러나 이들 변수들은 초겨울과 늦은 겨울의 일변화에 있어서는 의미있는 차이를 보이지 않았다. 하지만 F_0 와 F_m 사이의 J-단계와 I-단계에서의 미세한 변이형광 (V_J , V_I)과 기울기 $(dv/dt)_0$ 를 살펴보면, 이들 변이형광은 낮시간에 다소 감소하였다. 낮시간에 이들 변이형광의 감소는 광계II의 공여체에서 수용체로의 전자전달이 억제에 의해 비롯된다. 면적을 의미하는 변수들은 저온의 누적에 의해 이들 변수들은 증가하였으며, 겨울철 초기의 일변화에 있어서는 별로 차이를 나타내지 않았다. 하지만 겨울철

말

이들

변수들

Table 4-1. The values of experimental expressions of the JIP-test derived from the fluorescence transients O-J-I-P presented in Fig. 4-5.



Parameters	early August			early December			early February		
	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 ($\mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$)	0.71	728.5	0	0	495.4	0	0	591.5	0
F extremes									
F _o	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
F _m	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
F _v /F _o	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±0.010
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									
S _m	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
S _m /T _{max}	0.07±0.002	0.13±0.007	0.07±0.002	0.07±0.002	0.10±0.009	0.07±0.004	0.07±0.005	0.14±0.021	0.08±0.007

은 낮시간에 증가하는 경향을 보였다.

Fig. 4-5의 O-J-I-P 곡선과 Table 4-1의 변수로부터 여러 가지 구조적 변수와 기능적 변수들을 산출하였다 (Table 4-2). 겨울철에는 반응중심당 활성 (activities/RC) 중 ABS/RC가 겨울철 초보다는 늦은 겨울에 2배 정도 증가하였다. 이는 늦은 겨울에는 저온의 반복적인 노출에 의해 식물체가 스트레스를 받고 있음을 나타내는 것으로 엽면적 당 반응중심이 대부분 불활성화되어 있는 결과로 해석된다. 그러나 TRo/RC와 ETo/RC는 겨울철 초와 말에 큰 차이를 보이지 않는데 이는 겨울철 말에 ABS/RC의 대부분이 식물체에 손상을 미침을 간접적으로 보여주는 결과라고 할 수 있다. 그리고 겨울철 일변화에 있어서 이들 변수들의 변화양상을 비교해 보면, ABS/RC와 TRo/RC의 일변화는 거의 없으나 ETo/RC가 낮시간에 증가하는 패턴을 보였다. 각 단계별 에너지전이의 비율 (flux ratios) 중 TRo/ABS와 ETo/ABS는 저온에 노출되는 기간이 길어짐에 따라 대략 50% 감소하였다. 그리고, TRo/ABS는 각각의 일변화에 있어서는 차이를 보이지 않지만 나머지 변수들은 전반적으로 낮시간에 다소 증가하는 경향을 보였다. 그리고, 반응중심 밀도 (density of RCs)를 나타내는 변수 중 RC/CS_o와 RC/CS_m는 저온의 반복적인 노출에 의해 각각 50%, 25%로 감소하였으며, 각각의 일변화에 있어서는 낮에 다소 감소하였다가 밤에 증가하는 양상을 보였다. 한편, 엽면적 당 광계II활성 (activities/CS)을 살펴보면, open상태에서의 엽면적당 에너지전이를 의미하는 변수들과 closed상태에서의 엽면적당 에너지전이를 의미하는 변수들 모두 저온의 반복적인 노출에 의해 감소하였으며, 각각의 일변화에 있어서는 낮에 다소 증가하는 경향을 보였다. 마지막으로 활력도 (vitality index)를 나타내는 변수들은 저온의 반복에 의해 큰 폭으로 감소하였는데, 특히 $10 \cdot SF_{Ipo}$, $\Phi_{po}/(1-\Phi_{po})$, 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 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합해보면, 문주란은 겨울철 환경요인의 변화, 특히 저온의 반복적인 노출에 의해 F_m, F_v/F_o, F_v/F_m, ABS/CS, TRo/CS, RC/CS,

Φ_{PO} 와 $\Phi_{PO}/(1-\Phi_{PO})$ 등의 변수들의 뚜렷한 감소 또는 Sm, N, ABS/RC 등이 증가를 볼 수 있었다. 그리고 겨울철 일변화에 있어서도 RC/CS는 낮에 다소 감소

Table 4-2. The values of the different structural and functional parameters provided by the JIP-test, calculated from the data of Table 4-1 and the fluorescence transients O-J-I-P presented in Fig. 4-5.



Parameters	early August			early December			early February		
	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 ($\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$)	0.71	728.5	0	0	495.4	0	0	591.5	0
Fluxes-activities per 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									
TRo/ABS = 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
ETo/TRo = 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
ETo/ABS = 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 per 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

하였다가 밤에 증가하는 양상을 보였으며, ET_o/RC , ET_o/CS , $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ 는 낮에 증가하는 경향을 보였다. 따라서 이들 형광변수들을 저온 스트레스에 대한 지표로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.



4. 요약

본 연구는 환경요인의 변화, 특히 겨울철 저온에 의한 아열대성 식물의 반응기구를 규명하고 환경스트레스에 대한 식물의 반응을 정량화하고자, 저온 감수성 식물인 문주란을 대상으로 겨울철 일주기에 있어서 항산화효소, 엽록소형광과 O-J-I-P 패턴의 변화, 그리고 D1 단백질과 psbA 유전자의 발현 양상을 조사하였다. 겨울철 문주란의 항산화효소의 패턴을 살펴보면, 2월초에 SOD활성의 미약한 증가와 peroxidase, catalase, APX 활성의 감소가 관찰되었다. 겨울철 Fv/Fm은 밤과 낮에 관계없이 거의 일정한 값을 유지하지만 측정 시기에 따라 크게 변화하였다. 이는 겨울철 온도의 저하와 저온의 반복이 문주란 잎의 광합성효율에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 1-qN과 1-qP은 겨울철에는 측정시기에 상관없이 새벽과 밤에는 0.9 이상의 높은 값을 보이는데 반해, 낮시간에는 측정시기에 따라 차이는 있지만 조금 낮아져 각각 0.63~0.78과 0.50~0.60 범위로 낮아졌지만 여름철에 비해 그 감소폭은 적었다. 그리고 초겨울에는 D1 단백질과 psbA 전사체가 낮시간보다는 새벽과 밤에 더 많이 발현되는 것으로 나타났다. 늦은 겨울에는 초겨울에 비해 D1 단백질이 많이 감소하였으며, 일변화에 있어서는 낮시간에 발현 정도가 다소 낮았다. 초겨울과 늦은 겨울 모두 새벽과 밤 시간에 D1 단백질이 많고 낮시간에 적은 양상은 겨울철 낮시간에 광계II 활성이 억제될 수 있음을 시사하고 있으나, 초겨울이나 늦은 겨울 낮시간에 Fv/Fm의 억제가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 겨울철 O-J-I-P 곡선의 일변화를 살펴보면, 늦은 겨울에는 Fo의 값과 P-단계에서의 엽록소형광 세기가 겨울철 초에 비해 크게 감소하였다. 그리고 O-J-I-P 곡선에서 산출된 주요 변수들 중에 Fm과 Fv/Fo은 크게 감소하였으나 12월초와 2월초의 일변화에 있어서는 의미있는 차이를 보이지 않았다. 하지만 Fo와 Fm사이의 J-단계와 I-단계에서의 미세한 변이형광 (V_J, V_I)과 기울기 (dv/dt)_o는 낮시간에 다소 감소하였다. Sm과 N은 저온의 반복적인 노출에 의해 증가하였으며, 겨울철 초기의 일변화에 있어서는 별로 차이를 나타내지 않았으나 겨울철 말 이들 변수들은 낮시간에 증가하는 경향을 보였다. 그리고, RC/CS는 낮에 다소 감소하였다가 밤에 증가하는 양

상을 보였으며, ETo/RC , ETo/CS , $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ 가 낮에 증가하는 경향을 보였다. 따라서 일주기적 변화를 보이는 이들 형광변수들을 저온 하에서 식물의 생육상태를 진단하는 지표로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.



V. 종합고찰

식물은 주위의 환경으로부터 영향을 받지 않을 수 없으며 최적의 환경에 놓여 있더라도 온도, 수분, 염분, 광 등에 의한 스트레스를 어느 정도 받지 않을 수 없다. 그 중에서 온도는 흔히 일어날 수 있는 스트레스 요인 중 하나로 식물의 분포를 제한하고 생산성을 감소시키는 요인이 되기도 한다. 특히, 고온 또는 저온과 함께 다른 환경요인이 가해지면 그 피해는 심각해져 식물체의 고사를 유발하기도 한다. 식물이 생육환경에서 받는 수많은 스트레스와 항상성 유지의 관계에서 식물들이 나타내는 반응은 매우 관심있게 연구되어 왔다. 최근에는 스트레스가 식물체에 미치는 영향을 규명하기 위한 일환으로 항산화효소에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이는 환경스트레스가 가해지므로써 유발되는 산화적 스트레스가 자유 라디칼과 H_2O_2 와 같은 활성 산소종을 생성하여 세포에 손상을 입히게 되고 결국에는 식물의 성장을 감소시키기 때문이다 (Rao *et al.*, 1996). 그러나, 식물은 이러한 산화적 스트레스에 대응하여 ascorbate, glutathione, carotenoid 등과 같은 항산화제 또는 catalase, peroxidase, SOD, APX 등의 항산화효소 활성을 증가시킴으로써 스트레스에 대처하게 된다 (Foyer *et al.*, 1994). 이러한 사실로부터 식물체 내에 존재하는 항산화효소의 양적 또는 질적인 변화는 식물의 생리적 상태를 반영한다고 할 수 있다.

본 연구에서는 아열대성 식물 4종 (문주란, *Crinum asiaticum* var. *japonicum*; 박달목서, *Osmanthus insularis*; 죽절초, *Chloranthus glaber*; 파초일엽, *Asplenium antiquum*)을 대상으로 자연 환경요인의 변화에 의한 항산화효소 (SOD, peroxidase, catalase, APX)의 활성과 isoenzyme 패턴의 변화를 전기영동으로 조사하였다 (Figs. 2-2~2-5). 본 연구에서 조사한 항산화효소들 중에서는 peroxidase의 활성과 isoenzyme 패턴이 식물종이나 환경조건에 따라 가장 다양하게 나타났다. Peroxidase는 4종 모두에서 여름철보다 겨울철에 활성이 높았고, 문주란, 박달목서, 파초일엽에서는 겨울철에 특이적으로 발현되는 isoenzyme들도 관찰할 수 있었다. 하지만, 문주란의

peroxidase 활성이 여름철에 비해서 겨울철에 증가하였으나, 겨울철의 반복적인 저온에 노출된 2월초의 문주란 앞에서는 12월초 보다 감소하였다 (Fig. 4-2C). 이는 12월초의 온도가 여름철에 비해 상당히 낮아졌지만, 10°C 이상의 범위를 보이고 있어 식물체에 심각한 피해를 끼칠 수 있는 온도가 아니기 때문인 것으로 생각된다. 이는 열대 및 아열대 식물들이 10°C 이하의 온도에서 생육에 영향을 미친다는 사실로도 짐작할 수 있다 (Allen and Ort, 2001). 그리고 Fig. 3-5에서 살펴본 바와 같이 초겨울의 Fv/Fm이 여름철에 비해 다소 낮아졌으나 늦은 겨울보다는 여전히 높은 값을 나타내는 것으로도 알 수 있다. 그리고, peroxidase 활성이 여름철에 비해 높고 특이적으로 발현되는 isoenzyme들이 관찰되는데 이는 저온 스트레스를 극복하기 위한 식물의 적응기구가 활발히 작용한 결과로 생각된다 (Fig. 3-3B). 그러나 2월초의 peroxidase 활성의 감소는 10°C 이하의 낮은 온도와 저온의 누적에 의해 비가역적인 피해가 나타난 결과로 사료되는데, Fig. 3-5에서 Fv/Fm이 0.41의 값을 보이고 있는 것으로 이를 짐작할 수 있다. 이러한 결과는 종에 따라 차이는 있겠지만 저온감수성 식물인 옥수수수와 오이에서 온도가 감소함에 따라 peroxidase 활성이 감소하는 것과 일치한다고 볼 수 있다 (Feierabend *et al.*, 1992). Catalase는 문주란, 박달목서, 파초일엽에서 검출되었는데 계절적 발현양상은 차이를 보였다 (Fig. 2-3). 즉, 문주란 앞에서는 겨울철에 비해 여름철에 다소 높은 활성을 나타내었으며, 박달목서와 파초일엽에서는 겨울철에 높은 활성을 보였다. 그리고 겨울철 일변화에 있어서는 문주란과 박달목서에서는 새벽이나 밤보다 낮시간에 높은 활성을 보였는데 반해, 파초일엽에서는 낮시간에 활성이 낮았다. SOD는 문주란, 박달목서, 파초일엽에서 검출되었는데, 특히 박달목서에서는 겨울철에 높은 활성을 보였다 (Fig. 2-2). 그리고 문주란에서도 12월초에는 여름철과 유사한 양상을 보였으나, 2월초에는 다소 높은 활성을 보여 식물이 겨울철 환경요인에 의한 영향을 받고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4-2A). APX는 문주란과 파초일엽에서 관찰되었으나 계절적으로 큰 차이가 없었으며, 겨울철에 isoenzyme 패턴의 일주기적 변화가 관찰되었으나 그 정도는 미미하였다 (Fig. 2-5). 하지만 이들 항산화효소의 발현 또는 활성의 측면에서 볼 때, 문주란과는 달리 박달목서와 파초일엽은

겨울철에 SOD, peroxidase와 catalase 활성이 높기 때문에 겨울철 환경요인에 의한 영향을 받고는 있으나, 저온에 의한 산화적 스트레스를 극복하기 위한 식물의 적응기구가 활발히 작용하고 있다고 생각된다. 이는 박달목서와 파초일엽의 겨울철 F_v/F_m 이 여름철에 비해 다소 낮아졌으나 여전히 비교적 높은 0.73과 0.76의 값을 각각 나타내는 것으로도 추측해 볼 수 있다 (Figs. 2-8, 2-9). 그리고 문주란은 겨울철에 4종류의 항산화효소의 활성이 여름철에 비해 낮거나 또는 뚜렷한 변화가 없어 저온에 의해 생성된 활성산소를 효율적으로 제거하지 못하는 것으로 보이며, 이로 인해 식물의 생육에 영향을 미치는 것으로 보인다. 이는 겨울철 F_v/F_m 이 다른 3종에 비해 크게 감소하는 사실로도 알 수 있다. 이러한 결과로부터 식물 종에 따라 또는 생태적 입지에 따라 항산화효소의 발현 양상이 다를 수 있으며, 자연 환경의 변화가 식물의 광합성효율에 어느 정도 영향을 미치나 종에 따라 내성의 차가 있으며, 스트레스로 작용하는 환경범위가 다른 것으로 사료된다.

겨울철 문주란의 O-J-I-P 곡선은 측정시기에 따라 J, I, P-단계에서의 형광세기가 현저하게 감소하였다 (Fig. 3-4). 특히 P-단계에서의 형광세기 (F_p)는 광계II의 반응중심이 모두 단혀 전자수용체 quinone이 완전히 환원 상태에 있을 때의 형광을 의미하기 때문에 F_p 의 감소로 식물이 스트레스 상태에 놓여 있음을 알 수 있다. 그리고 이는 Fig. 3-5에서 겨울철 F_v/F_m 값의 점차적인 감소로 설명할 수 있으며, 겨울철 저온의 반복과 온도의 감소가 문주란 잎의 광합성효율에 영향을 미친 때문으로 생각된다. 이는 문주란 자생지의 12월 평균 온도가 10~15°C 범위에 있으며 1~2월에는 월평균 최고온도가 10°C 안팎으로 낮아지는 것으로 유추해 볼 수 있다. O-J-I-P 곡선 분석을 통해 산출된 형광변수들 중 F_m , F_v/F_o , ABS/CS 와 TRo/CS , RC/CS , Φ_{Po} , $\Phi_{po}/(1-\Phi_{po})$ 가 겨울철 저온에 의해 점차 감소하였으며, S_m , N , ABS/RC 가 뚜렷하게 증가하였다. 겨울철의 F_m 과 F_v/F_o 의 감소와 S_m 과 N 의 증가는 종에 따라 다소의 차이는 있으나 박달목서, 파초일엽, 죽절초에서도 공통적인 현상으로 나타나 겨울철 저온에 대한 지표로 사용이 가능할 것으로 보인다 (Table 2-1).

문주란의 겨울철 O-J-I-P 곡선의 일변화를 살펴보면, Fig. 4-5에서 12

월초와 2월초에 모두 F_o 와 F_m 사이의 J-단계와 I-단계에서의 미세한 변이형광 (V_J , V_I)과 기울기 (dv/dt)은 낮시간에 다소 감소하였다. S_m 과 N 은 겨울철 초기의 일변화에 있어서는 차이를 크게 나타내지 않았으나 겨울철 말에는 낮시간에 증가하는 경향을 보였다 (Table 4-1). 그리고, RC/CS 는 낮에 다소 감소하였다가 밤에 증가하는 양상을 보였으며, ET_o/RC , ET_o/CS , $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ 가 낮에 증가하는 경향을 보였다 (Table 4-2). 따라서 일주기적 변화를 보이는 이들 형광변수들을 저온과 광량에 의한 식물의 반응 지표로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 F_v/F_m 은 측정 시기에 따라 크게 변화하지만 각각의 일주기적 변화는 뚜렷하지 않았다 (Fig. 4-3). 하지만, $1-qN$ 과 $1-qP$ 는 겨울철에는 측정시기에 상관없이 새벽과 밤에는 0.9 이상의 높은 값을 보이는데 반해, 낮시간에는 측정시기에 따라 다소의 차이는 있지만 조금 낮아져 각각 0.63~0.78과 0.50~0.60 범위로 낮아졌지만 여름철에 비해 그 감소폭은 적었다. 그리고 초겨울에는 D1 단백질과 *psbA* 전사체가 낮시간보다는 새벽과 밤에 더 많이 발현되는 것으로 나타났다 (Fig. 4-4). 늦은 겨울에는 초겨울에 비해 D1 단백질이 많이 감소하였으며, 일변화에 있어서는 낮시간에 발현 정도가 다소 낮았다. 이와 같이 초겨울과 늦은 겨울 모두 새벽과 밤 시간에 D1 단백질이 많고 낮시간에 적은 양상은 겨울철 낮시간에 광계II 활성이 억제될 수 있음을 나타내주고 있다. 하지만, 초겨울이나 늦은 겨울 낮시간에 F_v/F_m 의 억제가 뚜렷하게 나타나지 않았다.

이상의 결과를 종합해보면, 문주란을 포함한 4종의 아열대성 식물들은 겨울철 저온에 의해 항산화효소의 활성 증가와 겨울철에만 특이적으로 나타나는 isoenzyme들을 관찰할 수 있어 식물에 따라 정도의 차이는 있지만 환경요인의 변화에 의한 스트레스 하에 놓여 있음을 알 수 있다. 그리고 겨울철에 엽록소형광이 문주란을 포함한 4종 모두에서 일주기적 변화를 보이지 않는 사실로도 알 수 있다. 특히, 문주란은 광계II의 최대효율을 의미하는 변수인 F_v/F_m 값이 다른 3종 보다 더 낮은 값을 보여 저온에 더 민감한 것으로 생각된다. 하지만, 겨울철 문주란의 $1-qN$ 은 낮시간에 다소 감소하여 낮시간에 여기된 에너지의 일부를 열의 형태로 방출하여 저온과 광에 의해 광계II의 반응중심이 손상을 미약하게나마 완화시키는 것으로 보인다. 그리고,

O-J-I-P 곡선 분석을 통해 산출된 형광변수들 중 저온 스트레스에 의해 F_m , F_v/F_o , F_v/F_m , ABS/CS , TR_o/CS , RC/CS , Φ_{p_o} 와 $\Phi_{p_o}/(1-\Phi_{p_o})$ 등의 변수들의 뚜렷한 감소 또는 S_m , N , ABS/RC 등이 증가를 볼 수 있었다. 따라서 이들 형광변수들을 저온 스트레스에 대한 식물의 생리적 상태를 진단하는데 지표로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 그리고 겨울철 일변화에 있어서도 낮시간에 RC/CS 의 감소와 ET_o/RC , ET_o/CS , $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ 의 증가가 나타나고 있어 저온과 광량이 함께 어울어진 미세한 환경 변화에 대한 스트레스 지표로의 사용 가능성을 보였다.

VI. 요약

본 연구는 아열대성 식물 4종 (문주란, 박달목서, 죽절초, 파초일엽)을 대상으로 자연 환경요인의 변화, 특히 겨울철 저온에 의한 항산화효소, 엽록소 형광과 O-J-I-P 패턴의 변화를 조사·분석하고, 환경 변화에 대한 식물의 생리적 상태를 진단할 수 있는 지표들을 제시하였다.

항산화효소의 활성과 isoenzyme 패턴은 식물종에 따라 또는 환경요인의 변화에 따라 차이를 보이지만 그 계절적 그리고 일주기적 변화가 관찰되었다. 특히, peroxidase의 활성과 isoenzyme 패턴이 식물종이나 환경조건에 따라 가장 다양하게 나타났다. Peroxidase는 4종 모두에서 여름철보다 겨울철에 활성이 높았고 문주란, 박달목서, 파초일엽에서는 겨울철에 특이적으로 발견되는 isoenzyme들도 관찰할 수 있었다. O-J-I-P 곡선에서 4종 모두 여름철에 비해 겨울철에 O-단계에서의 형광세기는 증가하고, P-단계에서의 형광세기는 감소하였다. 특히 P-단계에서의 감소는 문주란에서 현저하게 나타났다. O-J-I-P 곡선으로부터 산출된 형광변수들 중에서 종에 따라 다소 차이는 있으나 4종 모두에서 겨울철에 Sm, N 등의 증가와 Fm, Fv/Fo 등의 감소가 관찰되었다. 그리고 여름철에는 새벽과 밤에 광계II의 광화학적효율, 즉 Fv/Fm이 0.8이상의 높은 값을 보이지만 겨울철에는 모든 종에서 0.8 이하의 값을 나타내었다. 더군다나, 겨울철에는 일주기적 변화가 뚜렷하지 않았다. 따라서, 이들 4종의 아열대성 식물은 계절에 따라 항산화효소의 활성과 isoenzyme 패턴이 달라지고 Fv/Fm값이 낮아져서 겨울철 저온에 의해 영향을 받는 것으로 해석된다.

저온에 민감한 문주란은 겨울철에 O-J-I-P 곡선의 J, I, P-단계에서 형광세기가 현저하게 감소하였다. 그리고 O-J-I-P 곡선 분석을 통해 산출된 형광변수들 중에 Fm, Fv/Fo, ABS/CS, TRo/CS, RC/CS, Φ_{PO} 와 $\Phi_{po}/(1-\Phi_{po})$ 가 겨울철에 점차적으로 감소하였으며, Sm, N, ABS/RC는 뚜렷하게 증가하였다. 그리고 Fv/Fm은 여름철에 0.84의 높은 값을 보이고 일주기적 변화를 나타내나 겨울철에는 점차 낮아지고 일주기적인 변화 또한 나타나지 않

았다. 하지만, $1-qN$ 과 $1-qP$ 는 겨울철에는 일주기적 변화양상이 뚜렷하여 새벽 (06:00)과 밤 (20:00)에는 0.9 이상의 높은 값을 보이고 낮시간 (12:00)에는 각각 0.63~0.78과 0.50~0.60 범위로 낮아졌다. 그리고 D1 단백질은 겨울철에 새벽과 밤보다 낮시간에 발현 정도가 다소 낮았으며 초겨울에 비해 늦은 겨울에는 발현 정도가 낮은 것으로 나타났다. 겨울철 일변화에 있어서 엽록소형광 변수들 중에서 RC/CS는 낮에 다소 감소하였다가 밤에 증가하는 양상을 보였으며, ET_o/RC , ET_o/CS , $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ 가 낮에 증가하였다. 특히, 겨울철 저온에 의해 F_m , F_v/F_o , F_v/F_m 의 감소와 S_m 과 N 의 증가, 그리고 겨울철 낮시간에 RC/CS의 감소와 ET_o/RC , ET_o/CS , $\Psi_o/(1-\Psi_o)$ 의 증가는 문주란 뿐만아니라 박달목서, 파초일엽, 죽절초에서도 공통적인 현상으로 나타나고 있어, 이들 변수들을 저온 스트레스 또는 저온과 고광이 어울어진 미세한 환경 변화에 대한 식물의 생리적 상태를 진단하는데 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

주요어: 아열대성 식물, 문주란, 환경스트레스, 항산화효소, 엽록소형광, O-J-I-P 분석, 엽록소형광 변수.

VII. 참고문헌

- Allen, D.J. and D.R. Ort. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*. 6(1):36-42.
- Alscher R.G. and J.L. Hess. 1993. *Antioxidants in higher plants*. CRC Press, Boca Raton, pp.1-174.
- Anderson M.D., T.K. Prasad and C.R. Stewart. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol*. 109:1247-1257.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant*. 85:235-241.
- 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.
- Ball, M.C., J.A. Butterworth, J.S. Roden, R. Christian and J.G. Egerton. 1994. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Aust. J. Plant Physiol*. 22:311-319.
- Barthélemy, X., R. Popovic and F. Franck. 1997. Studies on the O-J-I-P transient of chlorophyll fluorescence in relation to photosystem II assembly and heterogeneity in plastids of greening barley. *J. Photochem. and Photobiol. B: Biol*. 39:213-218.

- Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44:276-287.
- Berry, J. and O. Björkman. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:491-543.
- Bolhar-Nordenkamp, H.R., S.P. Long, N.R. Baker, G. Öquist, U. Schreiber, E.G. Lechner. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecol.* 3(4):497-514.
- Bowler, C., L. Slooten, S. Vandenbraden. 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* 10:1723-1732.
- Bowler, C., M. Van Montague, and D. Inzé. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
- Briantais, J.M., C. Vernitte, M. Picaud and G.H. Krause. 1979. A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 548:128-138.
- Castillo, E.J. 1992. Peroxidase and stress. In *Plant Peroxidase, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects* (Penel, C., T.H. Gaspar and H. Greppin eds.) Univ of Genève. pp.187-203.
- Danyluk, J. and F. Sarhan. 1990. Differential mRNA transcription

during the induction of freezing tolerance in spring and winter wheat. *Plant Cell Physiol.* 31:609-619.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Report.* 1:19-21.

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.

Demmig-Adams B. and W.W.III. Adams. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 43:599-626.

Dormling, I. 1982. Frost resistance during bud flushing and shoot elongation in *Picea abies*. *Silva Fennica*, 16:167-177.

El-saht, H.M. 1998. Responses to chilling stress in French bean seedlings: antioxidant compounds. *Biologia Plantarum*. 41(3):395-402.

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, R.G. Campanile, N. Di Fonzo. 1994. Photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and drought tolerance in different durum wheat (*Triticum durum*) cultivars. *J. Agric. Sci., Cambridge* 122(2):183-192.

Foyer, C.H., H. Lopez Delgado, J.F. Dat, and I.M. Scott. 1997.

Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100:241-254.

Foyer, C.H., M. Lelandais, E.A. Edwards and P.M. Mullineaux. 1991. The role of ascorbate in plant, interactions with photosynthesis and regulatory significance. In: Pell, E.J. and Steffen, K.L. (Eds.), *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism. Current Topics in Plant Physiology*, vol. 6. American Society of Plant Physiologists, Rockvills, M.D., pp.131-144.

Foyer, C.H., P. Descourvieres and K.J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17:507-523.

Fridovich, I. 1974. Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.* 41:35-97.

Fryer, M.J., J.R. Andrews, K. Oxborough, D.A. Blowers, N.R. Baker. 1998. Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol.* 116:571-580.

Gupta A.S., J.L. Heinen, A.S. Holaday, J.J. Burke, and R.D. Allen. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic CuZn-superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:1629-1633.

Hetherington, S.E., J. He, and R.M. Smillie. 1989. Photoinhibition at low temperature in chilling-sensitive and resistant plants. *Plant Physiol.* 90:1609-1615.

- Hodges, D.M., C.J. Andrews, D.A. Johnson, and R.I. Hamilton, 1997. Antioxidant enzymes responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *J. Exp. Bot.* 48:1105-1113.
- Huner, N.P.A., D.P. Maxwell, G.R. Gray, L.V. Savitch, M. Krol, A.G. 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.
- Huner, N.P.A., G. Öquist and F. Sarhan. 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci.* 3(6):224-230.
- Inze D. and M. Van Montagu. 1995. Oxidative stress in plants *Curr Opin Biotechnol.* 6:153-158.
- Kamaluddin, M. and J. Grace. 1992. Photoinhibition and light acclimation in seedlings of *Bischofia javanica*, a tropical forest tree Asia. *Ann. Bot.* 69:47-52.
- Karimzadeh, G., D. Francis and M.S. Davies. 2000. Low temperature-induced accumulation of protein is sustained both in root meristems and in callus in winter wheat but not in spring wheat. *Annals of Botany* 85:769-777.
- Kautsky, H. and A. Hirsh. 1931. Neue Versuche zur Kohlensäure assimilation. *Naturwissenschaften.* 19:96.
- Kitajima, M. and W.L. Butler. 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta.* 376:105-115.
- Kratsch, H.A. and R.R. Wise. 2000. The ultrastructure of chilling

stress. *Plant Cell Environ.* 23:337-350.

Krüger, G.H.J., M. Tsimilli-Michael, and R.J. Strasser. 1997. Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiol. Plant.* 101:265-277.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685.

Lee, D.H. and C.B. Lee, 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159:75-83.

Lichtenthaler, H.K. and J.A. Miehl. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2:316-320.

Lidon, F.C. and F.S. Henniques. 1993. Oxygen metabolism in higher plant chloroplasts. *Photosynth.* 29:249-279.

Long S.P., S. Humpries and P.G. Falkowski. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:633-662.

Lovelock, C.E., M. Jebb and C.B. Osmond. 1994. Photoinhibition and recovery in tropical plant species: Response to disturbance, *Oecologia.* 97:297-307.

Lynch, D.V. 1990. Chilling injury in plants: the relevance of membrane lipids. In: F. Katterman (ed.), *Environmental Injury to Plants.* New York: Academic Press, pp.17-34.

- Lyons J.M. 1973. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:445-466.
- McCord, J.M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocyanin (hemocyanin). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
- Mckersie, B.D. and Y.Y. Leshem, 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers. pp.256.
- Michaeli, R., S. Philosoph-Hadas, J. Riov, Y. Shahak, K. Ratner and S. Meir. 2001. Chilling-induced leaf abscission of *Ixora coccinea* plants. III. Enhancement by high light via increased oxidative processes. *Physiologia Plantarum* 113:338-345.
- Mittler, R. and B.A. 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.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acid. Res.* 8:4321-4325.
- Nilsson, H.E. 1995. Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopatho.* 33:489-527.
- Ögren E. and J.R. Evans. 1992. Photoinhibition of photosynthesis *in situ* in six species of *Eucalyptus*. *Aust. J. Plant Physiol.* 19:223-232.
- Öquist, G., D.H. Greer and E. Gren. 1987. Light stress at low temperature. In photoinhibition. D.J. Kyle, C.B. Osmond and C.J.

Arntzen (eds.). Elsevier. Amsterdam. pp.67-87.

Osmond, C.B. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. Baker, N.R. and Bowyer, J.R., Photoinhibition of photosynthesis: From molecular mechanism to the field. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford. pp.1-24.

Ouzounidou, G., M. Moustakas and R.J. Strasser. 1997. Sites of action of copper in the photosynthetic apparatus of maize leaves: kinetic analysis of chlorophyll fluorescence, oxygen evolution, absorption changes and thermal dissipation as monitored by photoacoustic signals. Aust. J. Plant Physiol. 24:81-90.

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.

Peuelas, J. and I. Filella. 1998. Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status. Trends Plant Sci. 3:151-156.

Polle, A. 1997. Defense against photooxidative damage in plants, In: J.G. Scandalios (Ed.), Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. pp.623-666.

Polle, A., P. Schwang and C. Rudolf. 2001. Developmental and seasonal changes of stress responsiveness in beech leaves (*Fagus sylvatica* L.). Plant Cell Environ. 24:821-829.

- Powles, S.B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:15-44.
- Powles, S.B., J.A. Berry and O. Björkman. 1984. Interaction between light and chilling temperature on the inhibition of photosynthesis in chilling-sensitive plants. *Plant Cell Environ.* 6:117-123.
- Quick, W.P. and M. Stitt. 1989. An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 977:287-296.
- Raison, J.K. and J.M. Lyons. 1986. Chilling injury: a plea for uniform terminology. *Plant Cell Environ.* 9:685.
- Rao, M.V., G. Paliyath, D.P. Ormrod, 1996. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110:125-136.
- Ritamaki, E., R. Salo, E. Lehtonen and E.M. 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.
- Russel, A.W., C. Critchley, S.A. Robinson, L.A. Franklin, G.R. Seaton, W.S. Chow, J.M. Aderson and C.B. Osmond. 1995. Photosystem II regulation and dynamics of the chloroplast D1 protein in *Arabidopsis* leaves during photosynthesis and photoinhibition. *Plant Physiol.* 107:943-952.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory Manual.* Cold spring harbor laboratory press. Cold

Spring Harbor, Chp. 7, 9.

Scandalias, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101:7-12.

Somersalo, S. and G.H. Krause. 1990. Photoinhibition at chilling temperatures and effects of freezing stress on cold acclimated spinach leaves in the field: a fluorescence study. *Physiol. Plant.* 79:617-622.

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. R.J. Strasser. 1996. Stress and stress management of land plants during a regular day. *J. Plant Physiol.* 148:445-455.

Srivastava, A. R.J. Strasser. 1997. Constructive and destructive actions of light on the photosynthetic apparatus. *J. Sci. Ind. Res.* 56:133-148.

Srivastava, A., B. Guissé, H. Greppin, R.J. 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.

Srivastava, A., R.J. Strasser, and Govindjee. 1999. Greening of peas: parallel measurements on 77K emission spectra, OJIP chlorophyll a fluorescence transient, period four oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. *Photosynth.* 37:365-392.

- Stirbet, A., Govindjee, B.J. Strasser and R.J. Strasser. 1998. Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: Modelling and numerical simulation. *J. Theor. Biol.* 193:131-151.
- Strasser, B.J. and R.J. Strasser. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test. In Mathis, P.(ed.) *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Kluwer Academic, The Netherlands. Vol. 5, pp.977-980.
- Strasser, R.J. 1997. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transient. *Photosynth. Res.* 52:147-155.
- Strasser, R.J., A. Srivastava, and M. Tsimilli-Michael. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: *Probing Photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation*(M. Yunus, U. Pathre and P. Mohanty, eds.), Taylor and Francis, London and New York, chapter 25, pp.445-483.
- Tottempudi K. Prasad, Marc D. Anderson, Barry A. Martin and Cecil R. Stewart, 1994, Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulator role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Tsimilli-Michael, M., G.H.J. Krüger, R.J. Strasser. 1996. About the perpetual atate changes in plants approaching harmony with their environment. *Archs. Sci. Genève* 49:173-203.

- Tyystjarvi E., K. Ali-Yrkko, R. Kettunen and E.M. Aro. 1992. Slow degradation of D1 protein is related to the susceptibility of low-light-growth pumpkin plants to photoinhibition. *Plant Physiol.* 100:1310-1317.
- Van Huystee, R.B. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase: Biosynthetic studies. *Annu Rev. Plant Physiol.* 38:205-219.
- Van Rensburg, L., G.H.J. Krüger, P. Eggenberg, R.J. Strasser. 1996. Can screening criteria for drought resistance in *Nicotiana tabacum* L. be derived from the polyphasic rise of the chlorophyll a fluorescence transient(OJIP)? *S. Afr. J. Bot.* 62:337-341.
- Walker, M.A. and B.D. McKersie, 1993. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *J. Plant Physiol.* 141:234-239.
- Walters, R.G. and P. Horton. 1991. Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth. Res.* 27:121-133.
- Wang C.Y. 1990. *Chilling Injury of Horticultural Crops.* CRC Press. Boca Raton, FL. pp.223-233.
- Woodbury, W., A.K. Spencer, M.A. Sthamann. 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzyme. *Anal. Biochem.* 44:301-305.
- Yu, Q. and Z. Rengel. 1999. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutase in narrow-leafed lupins. *Plant Sci.* 142(1):1-11.

오순자, 고정균, 김응식, 오문유, 고석찬. 1999. 두릅나무과 식물의 SOD활성과 광계 II의 광화학적 효율에 미치는 온도스트레스와 paraquat의 영향. 한국환경생물학회지 17(2):199-204.

오순자, 고정균, 김응식, 오문유, 고석찬. 2001. 한라산 구상나무 잎의 엽록소형광의 일변화와 계절적 변화. 한국환경생물학회지 19(1):43-48.

이정애, 신현웅, 이미영. 2000. 여러 가지 환경스트레스가 벼 유묘 퍼옥시다제 활성에 미치는 영향. 한국환경생물학회지 18(3):331-336.



Appendix I

1. Quantum yield in illuminated steady-state

1) qP (Photochemical quenching; fluorescence yield is lowered because of use of excitation energy for photochemical reactions)

1-qP : Coefficient(values range from 0 to 1) of photochemical quenching.

$$1-qP = (F_s - F_o) / (F_m - F_o)$$

F_o (= F_s) : chlorophyll fluorescence yield with all PSII centers open in the light-adapted state

F_o (= F_o) : chlorophyll fluorescence yield with all PSII centers open in the dark-adapted state

F_m (= F_m) : Maximum yield of chlorophyll fluorescence in the light-adapted state

2) qN (Non-photochemical quenching; all mechanisms that lower the fluorescence yield apart from photochemistry, divided into qE, qI and qT according to their relaxation kinetics)

qE (Energy dependent quenching : requires the build-up of a proton gradient; relaxes within seconds to minutes)

qI (Photoinhibitory quenching : this quenching is caused by photoinhibition and shows very slow relaxation kinetics in the range of hours)

qT (State-transition quenching : the major light-harvesting complex separates from PSII, thereby reducing the amount of excitation energy in PSII that can de-excited to fluorescence; relaxes within tens of minutes)

1-qN : Coefficient(values range from 0 to 1) of non-photochemical quenching.

$$1-qN = 1 - (F_v/F_o) / (F_v/F_o)$$

2. Fluorescence parameters

- Fundamental parameters

1) $(dv/dt)_o (= M_o)$: Slope at the beginning of the transient $F_o \rightarrow F_m$, maximal fractional rate of the photochemistry (i.e. difference between the Q_A reduction rate and the Q_A^- oxidation rate after the onset of illumination)

$$M_o = (dv/dt)_o = 4 \times (F_{300\mu s} - F_o) / (F_m - F_o) = 4 \times (F_{300\mu s} - F_o) / F_v$$

2) V_t : The relative variable fluorescence V at any given time

$$V_t = (F_t - F_o) / (F_m - F_o) = (F_t - F_o) / F_v$$

3) S_m : Normalized area

$$S_m = \text{Area} / (F_m - F_o) = \text{Area} / F_v$$

Area : area above the fluorescence transient

4) N : Turn over number of Q_A

$$N = S_m \times (M_o / V_j)$$

5) F_v/F_o : Ratio of photochemical and non-photochemical de-excitation fluxes of excited chlorophyll (Chl^*)

$$\begin{aligned} F_v/F_o &= \Phi_{P_0} / (1 - \Phi_{P_0}) = (TR_o/ABS) / (1 - TR_o/ABS) = \\ &(TR_o/ABS) / (DI_o/ABS) \\ &= TR_o/DI_o = k_p/k_n \end{aligned}$$



k_n : non-photochemical de-excitation fluxes

k_p : photochemical de-excitation fluxes

Chl^* : excited chlorophyll

$$\text{Chl}^* = (\text{ABS/RC}) \times (1/K_p + K_n)$$

- Quantum efficiencies of flux ratios

1) Φ_{PO} : Maximum quantum yield of primary photochemistry, equal to F_v/F_m

$$\Phi_{PO} = F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m = 1 - (F_o/F_m) = \text{TRo/ABS}$$

2) Ψ_o : Efficiency with which a trapped exciton can move an electron into the electron transport chain

$$\Psi_o = 1 - V_J = \text{ETo/TRo}$$

3) Φ_{EO} : Probability of a absorbed exciton moving an electron beyond Qa^-

$$\Phi_{EO} = (F_v/F_m) \times (1 - V_J) = \text{ETo/ABS}$$

- Specific fluxes or specific activities

1) ABS/RC : Absorption flux of photons per active reaction center (RC)

(measure for relative antenna size)

$$\text{ABS/RC} = (\text{TRo/RC})/\Phi_{PO} = (M_o/V_J) / [1 - (F_o/F_m)]$$

2) TRo/RC : Trapping of electrons per active reaction center (RC)

$$\text{TRo/RC} = (\text{TRo/ABS}) \times (\text{ABS/RC}) = (M_o/V_J)$$

3) ETo/RC : Electron flux per active reaction center (RC) beyond Q_A^-

$$ETo/RC = (TRo/RC) - M_o = (M_o/V_j) - M_o = (M_o/V_j) \times (1 - V_j) = (R_o/RC) \times (1 - V_j)$$

4) DIo/RC : Energy dissipation per active reaction center (RC)

$$DIo/RC = (ABS/RC) - (TRo/RC)$$

- Phenomenological fluxes or phenomenological activities

1) ABS/CS : Absorption flux of photons per cross section (CS)

$$ABS/CS = F_o \text{ or } F_m$$

2) TRo/CS : Trapping of electrons per cross section (CS)

$$TRo/CS = \phi_{PO} \times (ABS/CS)$$



3) ETo/CS : Electron flux per cross section (CS)

$$ETo/CS = \phi_{PO} \times \psi_o \times (ABS/CS)$$

4) DIo/CS : Energy dissipation per cross section (CS)

$$DIo/CS = (ABS/CS) - (TRo/CS)$$

5) RC/CS : Density of the active reaction center per excited cross section

$$RC/CS = (ABS/CS) / (ABS/RC)$$

- Vitality indexes (Structure-functional-index and Performance-index)

1) SFI_{PO} : Responds to structural and functional PSII events leading to

electron transport within photosynthesis

$$SFI_{PO} = (Chl_{RC}/Chl_{tot}) \times \phi_{PO} \times \Psi_0$$

$$Chl_{tot} = Chl_{antenna} + Chl_{RC}$$

2) SFI_{NO} : Refers to the energy that is dissipated or lost from photosynthetic electron transport

$$SFI_{NO} = [1 - (Chl_{RC}/Chl_{tot})] \times (1 - \phi_{PO}) \times (1 - \Psi_0)$$

3) PI_{PO} : Ratio of the two structure-functional-indexes

$$PI_{PO} = (SFI_{PO}/SFI_{NO}) = (Chl_{RC}/Chl_{antenna}) \times (\phi_{PO}/1 - \phi_{PO}) \times (\Psi_0/1 - \Psi_0)$$

4) RC/ABS : Density of reaction center per chlorophyll

$$RC/ABS = \phi_{PO} \times (V_J/M_0)$$



감사의 글

본 논문이 완성되기까지 도움을 주신 모든 분들께 이 지면을 빌어 감사드립니다. 오랜 시간동안 부족한 저를 세심한 지도와 사랑으로 이끌어 주신 지도교수인 고석찬 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그간의 충고와 경험은 앞으로 저에게 큰 힘이 될 것입니다. 부족한 논문의 심사를 맡아 세세한 부분까지 꼼꼼하게 신경을 써주셔서 전체적인 틀과 내용을 바로 잡아주시고 조언을 주신 서울대 권영명 교수님, 제주대 오덕철 교수님과 정충덕 교수님, 부산대 이춘환 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 박사과정에 있는 동안 격려해 주시고 깊은 관심으로 지켜봐주신 오문유 교수님, 이용필 교수님, 김원택 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 김세재 교수님께 진심으로 감사를 드립니다.

업룩소형광분석과 관련된 의문사항들을 친절하게 답변해주신 스위스 Genève 대학의 Strasser 교수님과 프로그램을 제공해주신 Rodriguez님께도 감사드립니다. 또한, 본 연구를 수행할 수 있게끔 연구비를 지원해주신 한국학술진흥재단에도 깊은 감사를 드립니다. 아울러, 모두 언급하지는 못하지만 생화학연구실에서 함께 생활하며 조언과 도움을 주신 여러 선배님과 후배들, 그리고 항상 관심과 격려를 보내준 과내의 모든 대학원생들에게도 감사드립니다.

본 연구수행에 있어 자료 채집과 더불어 조사기간 동안 문주란 자생지까지 기꺼이 동행해준 언니와 동생에게도 이 지면을 통해 고마움을 전합니다. 그리고 아낌없는 격려와 관심을 보여준 큰 언니, 작은 언니, 동생 가족들에게도 고마움을 전합니다. 끝으로 지금까지 저를 믿어주시고 무한한 사랑을 베풀어주신 부모님께 감사의 마음을 전하며, 항상 건강하시기를 빌면서 이 논문을 바칩니다.