

ORIGINAL ARTICLE

## 카드뮴 독성 평가를 위한 은행이끼의 엽록소형광 분석 및 환경지표 선발

오순자 · 고석찬<sup>1)\*</sup>

농촌진흥청 국립원예특작과학원 온난화대응농업센터, <sup>1)</sup>제주대학교 생물학과

### Chl a Fluorescence Characterization and Biomarker Selection from *Ricciocarpos natans* under Cadmium Stress

Soonja Oh, Seok Chan Koh<sup>1)\*</sup>

Agricultural Research Center for Climate Change, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA,  
Jeju 690-150, Korea

<sup>1)</sup>Department of Biology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

#### Abstract

The effects of cadmium ions ( $\text{Cd}^{2+}$ ) on the Chl a fluorescence of *Ricciocarpos natans* were investigated in order to determine whether Chl fluorescence can be used as a biomarker to estimate the physiological responses of plants to cadmium stress. In all plants treated with  $\text{Cd}^{2+}$ , the image of Fv/Fm, which represents the maximum photochemical efficiency of PS II, changed as the  $\text{Cd}^{2+}$  concentration increased, when treated for 48 h or more. Changes of  $\Phi_{\text{PSII}}$  and  $Q_p$  images were recognized even at  $10 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . The Chl a O-J-I-P fluorescence transient was also affected even at  $10 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . The fluorescence yield decreased considerably in steps J, I and P in plants treated with  $\text{Cd}^{2+}$ , although a typical polyphasic rise was observed in non-treated plants. The Chl fluorescence parameters, Fm, Fv/Fo, Sm, SFlabs, Plabs and ETo/CS, decreased as the  $\text{Cd}^{2+}$  concentration increased, while the Mo and Kn parameters increased. Peroxidase activity decreased significantly and catalase activity increased as the  $\text{Cd}^{2+}$  concentration increased. Because of its sensitivity to  $\text{Cd}^{2+}$  *Ricciocarpos natans* is useful in experiments investigating the responses of plants to cadmium exposure. Several parameters (Fm, Fv/Fo, Sm, SFlabs, Plabs, ETo/CS, Mo and Kn) can be applied to determine quantitatively the physiological states of plants under cadmium stress.

**Key words** : Cadmium stress, Chl a fluorescence, Fv/Fm, O-J-I-P transients, *Ricciocarpos natans*

#### 1. 서론

산업의 발달로 위해성을 지닌 화학물질이 대량으로 생산되고 있고, 그 중 일부는 토양과 수서 생태계로 유입되고 있다. 토양 및 수서 생태계를 오염시키는 물질에는 산업폐기물이나 폐수로부터 유입되는 중금속,

농업용 제초제와 살충제, 그리고 생활폐수에 포함된 질소와 인 화합물 등이 있다. 특히, 공장에서 배출되는 각종 중금속류가 함유된 산업 폐기물과 폐수가 생태계의 오염을 가중시키고 있으며, 식물의 생육장해는 물론, 먹이연쇄를 통해 생태계의 여러 영양단계로 전달되어 인간의 건강에도 심각한 영향을 미치게 된다.

Received 20 February 2013; Revised 25 March, 2013;

Accepted 30 May, 2013

\*Corresponding author : Seok Chan Koh, Department of Biology,  
Jeju National University, Jeju 690-756, Korea  
Phone: +82-64-754-3528  
E-mail: sckoh@jejunu.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(Nriagu와 Panyina, 1988). 중금속은 바위나 토양 광물의 풍화에 의해서 자연적으로도 발생되지만 대부분의 경우 생물이 이용할 수 없는 형태이며 낮은 농도로 존재한다. 그러나 공장에서 발생하는 산업폐기물이나 폐수를 비롯한 인간의 활동에 의해서 환경에 방출된 중금속들은 농도가 매우 높은 상태로 존재하는데, 최근 폐광지와 소각로의 증가로 토양, 대기, 해양, 담수 등에 중금속 농도가 매우 높게 나타나 사회적으로 문제가 되고 있다. 따라서 이러한 중금속 오염을 감소시키거나 오염된 환경으로부터 중금속을 제거시키고자 하는 연구들이 활발하게 진행되고 있다.

중금속 중 일부는 필수 미량원소로 식물에서 효소의 보조인자로 사용되기도 하지만, 세포 내에 일정 농도 이상으로 존재하게 되면 식물의 물질대사를 저해한다 (Jarvis 등, 1976). 카드뮴(Cd), 수은(Hg), 납(Pb), 구리(Cu)와 같은 중금속 이온들은 뿌리를 통하여 흡수되고 줄기나 잎으로 전이된다. 중금속에 대한 초본성 식물의 반응은 대부분 이온의 흡수 저해, 엽록소 함량의 감소 및 측근과 뿌리의 생육 저해 등으로 나타난다 (Kahle, 1993; Kelly 등, 1979). 카드뮴은 여러 세포구획들의 대사활성에 직·간접적으로 영향을 주게 되며, 특히 엽록체에서는 엽록소의 생합성이나 광화학적 반응 등 광합성의 억제로 나타난다 (Krupa와 Moniak, 1998; Padmaja 등, 1990; Stobart 등, 1985). 광계II (photosystem II; PS II)는 카드뮴에 지극히 민감해서, 그 기능이 광계 I (PSI)보다 더 광범위하게 억제된다 (Chugh와 Sawhney, 1999; Mallick와 Mohn, 2003). 최근의 연구에 의하면 카드뮴은 광계II의 전자공여체와 수용체 양쪽 모두에 영향을 미친다. 즉, 산소발생회로에 작용하여 산소 방출을 억제하기도 하고  $Q_A$  (plastoquinone A)에서  $Q_B$ 로의 전자전달을 억제하기도 한다 (Krupa와 Moniak, 1998; Sigfridsson 등, 2004). 또한, 카드뮴은 식물의 물질대사에 관여하는 효소를 교란하고, 간접적으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성시켜 식물체에 피해를 주고 결국에는 식물생육을 감소시킨다 (Prasad, 1995).

카드뮴의 위해성을 평가하기 위한 방법 중 물리화학적 분석은 측정과정이 복잡할 뿐만 아니라 대체로 비용이 많이 들고, 생물체에 미치는 생태독성이나 위해성에 대해서는 평가하기가 어렵다. 이러한 문제점

을 보완하기 위하여 다양한 생물종을 이용한 생물검정 시험법이 사용되고 있으며, 전 세계적으로 수생태계의 독성평가에 사용되고 있는 주요 식물군은 규조류 9종, 녹조류 15종, 대형수생식물 3종이다 (An 등, 2007). 그리고, 육상식물에 있어서는 대다수의 연구가 식물의 생육단계를 고려하지 않고, 식물 종자의 발아나 유묘의 생장에 미치는 영향 및 가시적인 피해증상 등을 확인하는 것에 그치고 있다 (Abu-Muriefah, 2008; Mahmood 등, 2007; Zheng 등, 2010). 반면에, 엽록소형광을 이용한 분석은 광합성 기구 중에서도 광계II의 반응을 조사하기 위한 비파괴적이고 객관적으로 신뢰할 수 있는 측정 방법이다 (Strasser와 Strasser, 1995). 따라서 본 연구에서는 토양과 담수 생태계에 서식하는 소식물체이면서 부유성 선태식물인 은행이끼(*Ricciocarpos natans* (L.) Corda)를 대상으로 카드뮴에 대한 엽록소형광 이미지, O-J-I-P 분석 및 항산화효소의 활성 등의 분석을 수행하여, 카드뮴 독성을 조기에 진단하기 위한 환경지표종으로서의 가치와 엽록소형광 변수들의 환경지표로서의 활용 가능성을 살펴보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 식물재료 및 배양

항온기에서 배양중인 은행이끼(*Ricciocarpos natans* (L.) Corda)를 대상으로 엽색이 균일한 상태의 식물체를 선별하여 실험재료로 사용하였다. 배양액은 Chollet (1993)의 방법에 의해 조제한 후, pH를 6.5로 조정하고 멸균하여 사용하였다. 배지는  $KNO_3$ (202 mg/ℓ),  $KH_2PO_4$ (50.3 mg/ℓ),  $K_2HPO_4$ (27.8 mg/ℓ),  $K_2SO_4$ (17.4 mg/ℓ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (49.6 mg/ℓ),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (11.1 mg/ℓ),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (6 mg/ℓ),  $H_3BO_3$ (5.72 mg/ℓ),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (2.82 mg/ℓ),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.6 mg/ℓ),  $(NH_4)Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (0.043 mg/ℓ),  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.078 mg/ℓ),  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.054 mg/ℓ) 등을 함유하도록 조제하였다. 배양은  $25 \pm 1^\circ C$ 의 온도와  $40 \sim 50 \mu mole/m^2/sec$  (14h light/10h dark)의 광조건 하에서 배양하였으며, 2주 간격으로 계대 배양하였다. 카드뮴의 영향을 알아보기 위하여 배양액에 최종 농도가 0, 10, 50, 100  $\mu M$ 이 되도록 카드뮴을 첨가하여 동일한 광조건 하에서 5일간 배양하였으며, 모든 실험은 3회 반복하였다.

## 2.2. 광합성효율 분석

### 2.2.1. 형광이미지 분석

형광이미지는 Nedbal 등 (2000)의 방법에 따라 Imaging Fluorometer (FluorCam 700MF, Photon System Instruments, Czech)를 이용하여 분석하였다. 즉, 15분간 광을 차단하여 암적응시킨 식물의 잎에  $1,500 \mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$ 의 saturation light와  $100 \mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$ 의 actinic light를 조사하고 quenching analysis로 엽록소형광을 유도하였다. 포화광을 켜진 후 1,000 ms와 3,960 ms에서 방출되는 형광을 CCD 카메라로 포획하여 각각  $F_0$ 와  $F_m$ 의 형광이미지로 나타내었으며, 이로부터  $F_v/F_m$ 의 형광이미지를 산출하여 제시하였다. 그리고,  $\Phi_{PSII}$  (quantum efficiency of PS II),  $Q_P$  (photochemical quenching),  $Q_N$  (non-photochemical quenching),  $R_{fd}$  (variable chl fluorescence decrease ratio) 등의 이미지도 함께 제시하였다.

### 2.2.2 O-J-I-P 분석 및 엽록소 형광변수 산출

O-J-I-P 곡선은 Plant Efficiency Analyzer (PEA; Hansatech Instrument Ltd., UK)를 이용하여 측정하였다 (Strasser와 Strasser, 1995). 즉, 15분간 광을 차

단하여 암적응시킨 식물의 잎에  $1,500 \mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$ 의 광량을 1초간 조사하여 O-J-I-P 곡선을 유도하였다. Time scale은 10  $\mu\text{s}$ 에서 1 s의 범위로 설정하고, 10  $\mu\text{s}$ 에서 2 ms까지는 1  $\mu\text{s}$  단위로, 2 ms에서 1 s까지는 1 ms 단위로 인식하도록 하였으며, 50  $\mu\text{s}$ (O-단계), 2 ms(J-단계), 30 ms(I-단계), 300 ms(P-단계)에서 엽록소형광 밀도를 분석하였다 (Srivastava 등, 1997). O-J-I-P 곡선의 분석으로 8개의 기본적 형광변수 ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_0$ ,  $V_J$ ,  $V_I$ ,  $Mo$ ,  $Sm$ ,  $N$ )들을 산출하였으며, 이를 토대로 다시 구조적 변수 (structural parameters:  $RC/CS$ ,  $\Phi_{PO}$ ,  $\Psi_O$ ,  $\Phi_{EO}$  등)와 기능적 변수 (functional parameters:  $ABS/CS$ ,  $TRo/CS$ ,  $ETo/CS$ ,  $DIo/CS$  등)들을 산출하였다 (Table 1). 그리고, 측정된 형광변수들을 토대로 광계II에서의 에너지 흐름의 변화를 pipeline model로 제시하였다.

## 2.3. 항산화효소 활성 분석

### 2.3.1. 조효소액의 제조

식물체의 잎을 1.0 g 씩 취하여 10 ml의 0.1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25  $\mu\text{M}$  polyvinyl-pyrrolidone, 0.1 mM

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

Abbreviation	Description
$F_0$	Initial fluorescence in dark adapted tissue
$F_m$	Maximum fluorescence in dark adapted tissue
$F_v/F_0$	Ratio of photochemical and non-photochemical de-excitation fluxes of excited chlorophyll
$V_J$	Relative variable fluorescence at the J-step
$V_I$	Relative variable fluorescence at the I-step
$Mo$	Slope at the beginning of the transient $F_0 \rightarrow F_m$ , maximal fractional rate of photochemistry
$Sm$	Normalized area
$N$	Turn over number of $Q_A$
$\Psi_O$	Probability of a trapped exciton moving an electron beyond $Q_A^-$
$\Phi_{EO}$	Probability of a absorbed exciton moving an electron beyond $Q_A^-$
$\Phi_{PO}$	Maximum yield of primary photochemistry, equal to $F_v/F_m$
$SFI_{abs}$	Responds to structural and functional PS II events leading to electron transport within photosynthesis
$K_P$	Photochemical de-excitation fluxes
$K_N$	Non-photochemical de-excitation fluxes
$PI_{abs}$	Performance index(PI) on absorption basis
$RC/ABS$	Total number of active reaction center per unit of absorbed light
$RC/CS$	Density of active reaction center per cross section
$ABS/CS$	Absorption flux of photons per cross section
$TRo/CS$	Trapping of electrons per cross section
$ETo/CS$	Electron flux per cross section
$DIo/CS$	Energy dissipation per cross section

ethylenediamine tetraacetic acid, 0.5% Triton X-100) 과 함께 얼음 위의 막자사발에서 마쇄한 후, 4℃에서 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

### 2.3.2. 전기영동

전기영동은 Laemmli (1970)의 방법을 변형하여 native gel 조건에서 실시하였다. 전기영동 시료는 효소액을 동량의 시료용 완충용액 (125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 0.005% bromophenol blue, 40% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol)과 혼합하여 사용하였다. 전기영동은 7.5%의 running gel을 사용하였으며, stacking gel은 3% gel을 사용하였다. 시료를 vertical slab gel에 loading하여 stacking gel에서는 50 V, running gel에서는 100 V로 전개하였다.

### 2.3.3. 효소활성의 선별 염색

Peroxidase활성은 Rao 등 (1996)의 방법을 변형하여 검출하였다. 전기영동이 끝난 겔을 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유하는 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.8)에 10분 동안 담근 후 1.4 mM 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 용액에 담가 어두운 곳에서 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다. Catalase활성의 검출은 Woodbury 등 (1971)의 ferricyanide 염색법을 사용하여 실시하였다. 전기영동이 끝난 겔을 3.27 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 들어있는 증류수에 넣어 암상태에서 10분간 반응시킨 후 3.7 mM ferric chloride-3 mM potassium ferricyanide 용액에 넣어 5~10분간 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다.

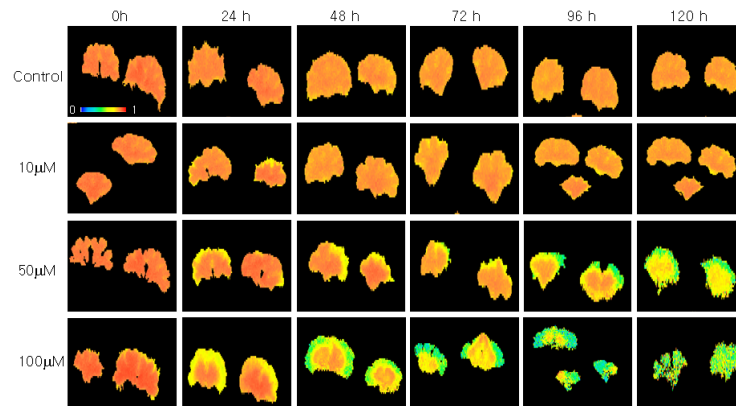
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 카드뮴 스트레스에 의한 형광이미지의 변화

카드뮴 스트레스 하에서 은행이끼는 배양 기간이 길어지거나 또는 카드뮴 농도가 증가함에 따라 잎 가장자리 부분에서부터 색이 점차 하얗게 또는 노랗게 변하였다. 즉, 은행이끼는 카드뮴 처리 3일까지는 처리한 농도에 관계없이 전체적으로 녹색 상태를 보이거나 배양 4일째부터는 50  $\mu$ M 이상의 고농도에서 잎 가장자리 부분이 점차 탈색되어 황백화 현상이 나타났다 (테이타 미제시). 이러한 현상은 카드뮴이 오염된 토양에서 자라는 *Brassica napus*에서도 관찰되는데

(Baryl 등, 2001), 이는 카드뮴이 식물 잎의 광합성 색소의 감소를 야기하여 백화현상을 유도하고, 잎과 뿌리의 세포를 파괴하고, 식물의 생장에 영향을 주기 때문이다. 오이(*Cucumis sativus* L.), 완두(*Pisum sativum* L.), 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 등에서도 카드뮴에 의한 잎이나 뿌리의 발달 저해, 생체량이나 건체량의 감소 등이 보고된 바 있다 (Abu-Muriefah, 2008; Mahmood 등, 2007; Zheng 등, 2010). 본 연구에서 은행이끼도 카드뮴 스트레스가 잎의 황백화 현상을 야기할 뿐만 아니라 뿌리 조직에도 영향을 미쳐 식물의 생육을 저해하였다. 그러나 저농도에서 카드뮴의 독성을 육안으로 판별하기에는 어려움이 있으며 고농도에서도 다소 긴 시간이 소요되었다.

엽록소형광 이미지는 잎 조직 내 광합성 능력의 공간적인 분포를 모니터링하는데 이용할 수 있으며, 특히 암적응 후의 Fv/Fm 이미지를 통해 육안으로는 볼 수 없는 잎 내부의 생리적 피해정도를 확인할 수 있다 (Nedbal과 Whitmarsh, 2004). 본 연구에서는 식물의 카드뮴에 대한 내성 여부와 생리적 특성을 파악하기 위해 은행이끼를 대상으로 카드뮴의 농도를 달리하여 1일 간격으로 5일 동안 배양하면서 처리시간별로 Fv/Fm 이미지의 변화를 조사하였다 (Fig. 1). 그 결과, 10  $\mu$ M 카드뮴에서는 배양기간 동안 카드뮴 독성을 뚜렷하게 관찰할 수 없었다. 그러나 50  $\mu$ M 이상의 고농도에서는 배양시간이 누적됨에 따라 Fv/Fm 이미지가 뚜렷하게 변화하였다. 이는 카드뮴에 의한 독성이 잎조직의 광계II의 반응중심에 손상을 입힌 결과로 볼 수 있다. Fv/Fm 이미지는 처리 후 48시간이 경과하면서부터 카드뮴 영향이 뚜렷하게 나타나기 시작하였으며, 고농도의 카드뮴에 노출되었을 때에는 직접적으로 노출된 잎 가장자리에서부터 서서히 형광이미지가 변하고 있음을 확인할 수 있다. 그리고 카드뮴 농도에 의한 차이는 72시간이 경과되었을 때 뚜렷하게 나타났다. 광합성과 같은 생리적 반응은 중금속에 매우 민감하게 나타나는데 카드뮴에 노출된 옥수수(*Zea mays* L.)에서도 농도가 증가함에 따라 Fv/Fm값이 감소하는 것으로 보고되었으며 (Ekmekci 등, 2008), 광계II에서 광계I으로의 전자전달이 감소하거나 부분적으로 차단됨으로써 Q<sub>A</sub>의 재산화가 억제되어 Fv/Fm 값이 감소

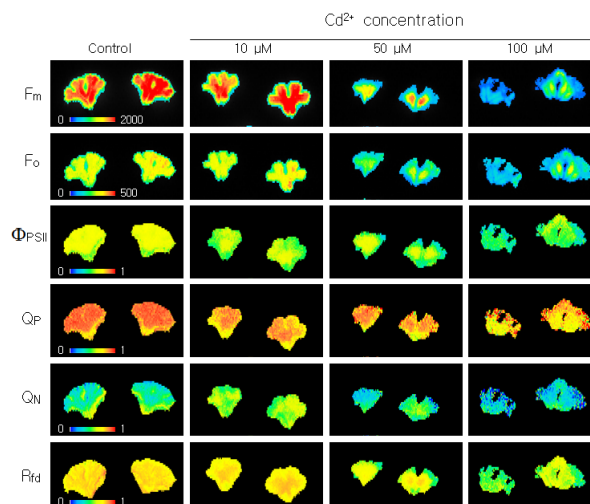


**Fig. 1.** Chlorophyll fluorescence imaging of *Ricciocarpus natans* (L.) Corda under cadmium stress. The images were taken during 5 days after the cadmium treatment. Each plant is colored in a relative scale based on the fluorescence intensities of  $F_v/F_m$ .

하는 것으로 알려지고 있다 (Mallick와 Mohn, 2003).

$F_m$ ,  $F_o$ 와  $R_{fd}$ 도  $F_v/F_m$ 과 같이 고농도의 카드뮴에서 이미지가 뚜렷하게 변화하였으며,  $\Phi_{PSII}$ 와  $Q_P$ 는 고농도에서는 물론 10  $\mu M$ 의 저농도에서도 이미지의 변화를 뚜렷하게 관찰할 수 있었다.  $Q_N$ 은 앞서의 다른 변수들과는 달리 10  $\mu M$ 의 저농도에서는 그 값이 오히려 증가하고 50  $\mu M$  이상에서는 감소하는 양상을

보였다(Fig. 2). 이러한 결과로부터 형광이미지의 분석은 황백화 현상 등 가시적인 징후가 발현되기 전에 카드뮴 독성을 신속하게 평가할 수 있고 동시에 시각적으로 확인이 가능하여 스트레스에 대한 식물 징후의 조기 진단에 유용하게 활용될 수 있음을 보여주고 있다. 이들 변수들의 변화는 옥수수(*Zea mays* L.)의 카드뮴에 대한 내성을 연구하는데도 이용되고 있는데



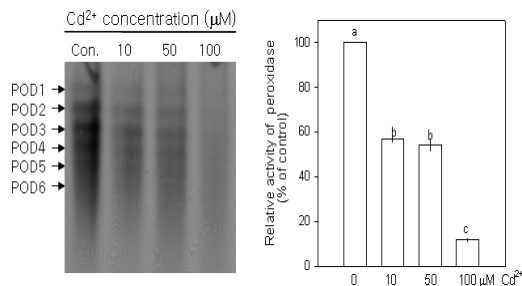
**Fig. 2.** Chlorophyll fluorescence imaging of *Ricciocarpus natans* (L.) Corda under cadmium stress. The images were taken at 3 days after cadmium treatment. Each plant is colored in a relative scale based on the fluorescence intensities of the parameter such as maximum fluorescence( $F_m$ ), initial fluorescence( $F_o$ ), quantum efficiency of PS II ( $\Phi_{PSII}$ ), photochemical quenching( $Q_P$ ), non-photochemical quenching( $Q_N$ ) and variable chlorophyll fluorescence decrease ratio( $R_{fd}$ ).

카드뮴 스트레스에 민감한 품종은 농도가 증가함에 따라 Fm, Fv/Fm,  $\Phi_{PSII}$ 와  $Q_P$ 의 감소가 뚜렷하게 나타나는 것으로 보고되었다(Ekmekci 등, 2008). 그러나, Fm, Fo와  $R_{fd}$  등은 고농도의 카드뮴에서는 진단이 용이하지만 10  $\mu$ M 이하의 저농도에서는 그 독성을 판별하는데 어려움이 있을 것으로 보이며,  $\Phi_{PSII}$ 와  $Q_P$ 는 10  $\mu$ M 이하의 낮은 농도에서도 카드뮴 스트레스에 민감하여 그 독성을 조기에 진단하는 데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 보인다. 하지만, 형광이미지는 카드뮴의 독성을 가시적으로 신속하게 파악하는데 큰 이점이 있을 수 있으나 정량적이고 객관적인 판정에는 한계가 있음을 알 수 있다.

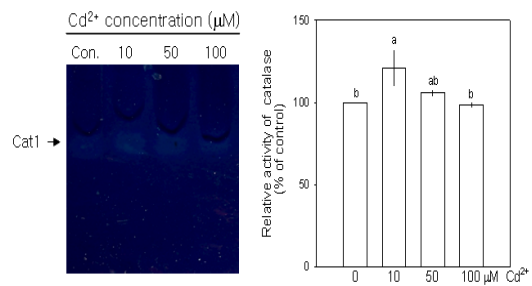
### 3.2. 항산화효소 활성의 패턴

식물이 각종 환경스트레스를 받으면 생체내 산소( $O_2$ )는 반응성이 높은 독성의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변하며 (Alscher와 Hess, 1993), 이들은 강한 산화력을 가지고 있어 핵산, 단백질, 지질 등의 변성을 야기할 뿐만 아니라 광합성 억제 등 심각한 생리적 장애를 일으키고, 결국에는 식물체를 고사시키기도 한다 (Alscher와 Hess, 1993; Asada, 1999). 활성산소에 대한 식물의 방어기작은 활성산소의 형성을 억제하거나 생성된 활성산소를 제거하는

것인데, peroxidase, catalase, superoxide dismutase 등의 효소에 의한 방어 기작과 ascorbate, carotenoid 등의 항산화물질에 의한 방어기작으로 구분할 수 있다 (Alscher와 Hess, 1993; Inze와 Van Montagu, 1995). 본 연구에서는 카드뮴 스트레스에 대한 은행이끼의 항산화 반응을 알아보기 위하여 peroxidase와 catalase 등 항산화효소의 활성 패턴을 전기영동으로 조사하여 비교하였다 (Fig. 3과 4). Peroxidase isoenzyme은 전체적으로 6개의 밴드가 검출되었으며, 이들 isoenzyme들은 카드뮴 농도가 증가함에 따라 그 활성이 점차 감소하는 양상을 보였으나, 카드뮴에 의해 특이적으로 유도되는 isoenzyme은 관찰되지 않았다 (Fig. 3). Catalase는 단일 밴드로 검출되었으며 그 활성은 대조구에 비해 카드뮴 스트레스 하에서 다소 높은 것으로 나타났다 (Fig. 4). 항산화효소들은 스트레스에 의해 생성되는 활성산소종을 제거하는 기능을 가지고 있으며, 저분자 항산화제와 마찬가지로 스트레스 하에서의 식물의 생존 또는 내성과 관련이 있다 (Foyer 등, 1991). 오이(*Cucumis sativus* L.)에서 카드뮴 내성 세포에서는 peroxidase 활성이 증가하고 catalase 활성이 감소하는데 반해, 감수성 세포에서는 반대로 peroxidase 활성이 감소하고 catalase 활성이 증가하는 것으로 보고되었다 (Gzyl 등, 2009). 본 연구에서도



**Fig. 3.** Isoenzyme pattern and activity of peroxidase of *Ricciocarpus natans* (L.) Corda under cadmium stress. Proteins were separated in non-denaturing polyacrylamide gel, the isoenzymes were visualized and evaluated as described in Materials and Methods. Plants were incubated in liquid medium containing different  $CdCl_2$  concentration (0, 10, 50 and 100  $\mu$ M  $CdCl_2$ ) for 3 days. Relative activity data are means $\pm$ S.D. (n=3). Different letters in the indicate significant differences as compared to the control of each column ( $P<0.05$ ).



**Fig. 4.** Isoenzyme pattern and activity of catalase of *Ricciocarpus natans* (L.) Corda under cadmium stress. Proteins were separated in non-denaturing polyacrylamide gel, the isoenzymes were visualized and evaluated as described in Materials and Methods. Plants were incubated in liquid medium containing different  $CdCl_2$  concentration (0, 10, 50 and 100  $\mu$ M  $CdCl_2$ ) for 3 days. Relative activity data are means $\pm$ S.D. (n=3). Different letters indicate significant differences as compared to the control of each column ( $P<0.01$ ).

은행이끼는 카드뮴 농도가 증가함에 따라 peroxidase 활성은 점차 감소하고 catalase 활성은 다소 증가하여 카드뮴의 영향을 받고 있음을 알 수 있다. 이는 은행이끼가 카드뮴에 의해 산화적 스트레스를 받고 있으며 그로 인해 잎조직의 세포사멸이 일어나 점차 황백화가 일어나는 것으로 해석할 수 있다. 그리고, 이러한 산화적 스트레스는 광계II에도 영향을 미쳐 Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이  $F_v/F_m$ 을 비롯한  $F_m$ ,  $F_o$ ,  $R_{fd}$ ,  $\Phi_{PSII}$  등의 형광이미지의 변화를 야기하는 것으로 보인다.

### 3.3. O-J-I-P 곡선 및 형광변수의 변화

O-J-I-P 곡선은 광계II의 전자수용체 풀의 연속적인 환원을 나타내며 (Govindjee, 1995), 암적응된 잎에 빛을 비추어 유도해 낼 수 있는데 크게 3단계로 구분할 수 있다 (Strasser와 Govindjee, 1992). 먼저 O(50  $\mu$ s)와 J(2 ms)를 연결하는 O-J 구간은 광계II의 반응중심에서 초기 전자수용체인  $Q_A$ 의 광화학적 환원, 즉  $Q_A^-Q_B$ 의 축적을 의미하며, J(2 ms)와 I(60 ms)를 연결하는 J-I 구간은 광계II의 반응중심에서  $Q_A^-Q_B^-$ 의 축적을 반영하는 것으로 광계II의 donor 부분 (water splitting activity)에 의해 조절된다. 마지막으로 I(60 ms)와 P(300 ms)를 연결하는 I-P 구간에서는 광계II의 반응중심에서 plastoquinone pool (PQ pool)로의 전자전달활성, 즉  $Q_A^-Q_B^{2-}$ 의 축적을 의미한다

(Stirbet 등, 1998). 식물체가 빛, 온도, 수분 또는 화학적 스트레스 등에 의해 영향을 받았을 때, O-J-I-P 곡선의 양상은 변하게 된다. 일정한 배양환경에서 생육하고 있는 은행이끼를 대상으로 카드뮴의 농도를 달리하여 처리한 후 O-J-I-P 곡선(Fig. 5)과 이를 토대로 산출한 형광변수들을 제시하였다 (Fig. 6과 Table 2). O-J-I-P 곡선에서 카드뮴 농도가 증가할수록 J, I, P값이 크게 감소하고 있으며, 특히 10  $\mu$ M 이하의 저농도의 카드뮴 하에서도 형광세기가 감소하였다 (Fig. 5). 이는 광계II 반응중심의 전자수용체 quinone이 카드

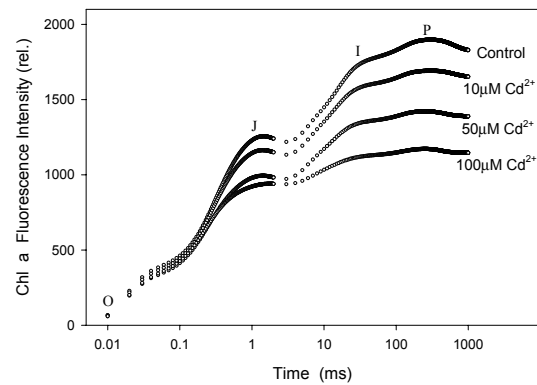


Fig. 5. Chlorophyll fluorescence transients O-J-I-P from leaves of *Ricciocarpus natans* (L.) Corda at 3 days after cadmium stress.

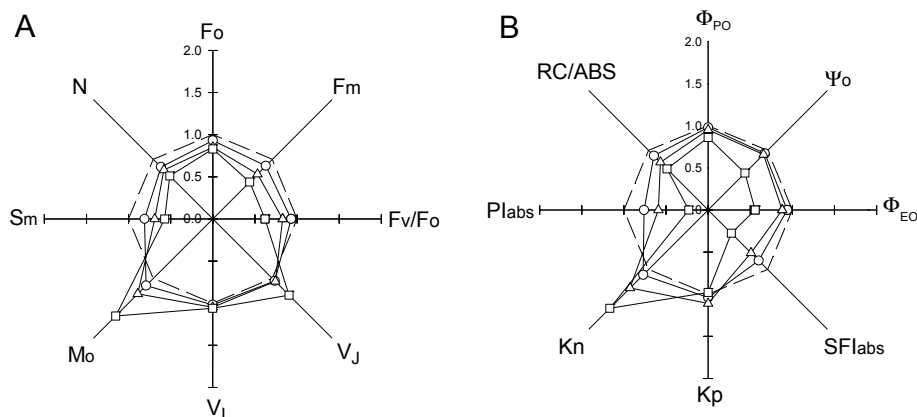


Fig. 6. Spider plots of selected parameters quantifying the behaviour of PSII from leaves of *Ricciocarpus natans* (L.) Corda at 3 days after cadmium stress. (A) Extracted and technical fluorescence parameters, (B) Vitality indexes (structure-function and performance indexes). Control, long dash; 10  $\mu$ M Cd, circle; 50  $\mu$ M Cd, triangle; 100  $\mu$ M Cd, square.

**Table 2.** Quantum efficiencies and effective absorption per cross section of PS II from leaves of *Ricciocarpus natans* (L.) Corda at 3 days after cadmium stress

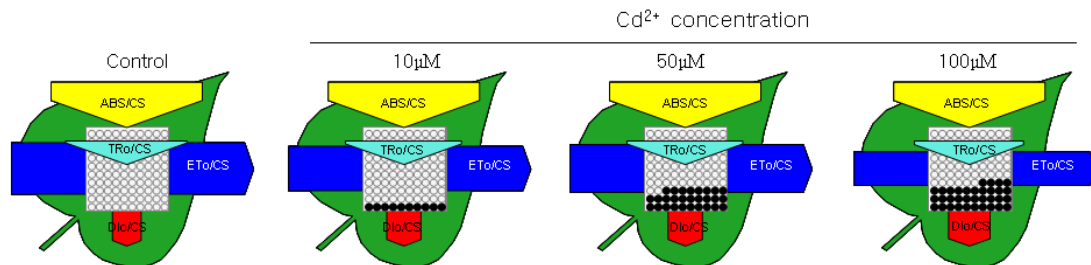
Cadmium concentration ( $\mu\text{M}$ )	Chl fluorescence parameters				
	RC/CS	ABS/CS	TRo/CS	ETo/CS	DIo/CS
0 (Control)	151.1 $\pm$ 9.0 <sup>b</sup>	383.8 $\pm$ 14.6 <sup>a</sup>	305.9 $\pm$ 13.6 <sup>c</sup>	132.6 $\pm$ 8.5 <sup>c</sup>	77.9 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
10 $\mu\text{M}$	131.2 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	364.8 $\pm$ 11.6 <sup>a</sup>	286.0 $\pm$ 8.3 <sup>bc</sup>	116.9 $\pm$ 3.6 <sup>bc</sup>	78.8 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>
50 $\mu\text{M}$	105.4 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	333.0 $\pm$ 12.4 <sup>a</sup>	254.7 $\pm$ 9.7 <sup>ab</sup>	102.7 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	78.3 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>
100 $\mu\text{M}$	92.2 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>	342.8 $\pm$ 10.0 <sup>a</sup>	236.1 $\pm$ 10.8 <sup>a</sup>	64.5 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>	106.7 $\pm$ 8.3 <sup>b</sup>

Each value was expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of five replicates. Different letters within each column indicate significant differences between treatments ( $P < 0.01$ ).

물에 의해 환원상태에 놓여있음을 나타내며, Fig. 1에서 보는 바와 같이 광계II의 광합성효율, 즉 Fv/Fm의 감소를 야기한다. O-J-I-P 분석을 통해 산출된 형광변수들 중에서 Fo, Fm, Fv/Fo, Sm, N은 카드뮴 농도가 증가할수록 점차 감소하였고, Mo는 오히려 크게 증가하였다 (Fig. 6A). 특히, Fm, Fv/Fo, Sm 값의 감소와 Mo값의 증가는 다른 형광변수들에 비해 뚜렷하게 나타났다. 또한 활력도를 나타내는 변수들 중에  $\Psi_o$ ,  $\Phi_{EO}$ , SFlabs, Plabs, RC/ABS 등 5개의 형광변수는 카드뮴 농도의 증가에 따라 크게 감소하였으며, Kn은 뚜렷하게 증가하였다 (Fig. 6B). 이처럼 카드뮴 스트레스에 의한 이들 형광변수들의 변화는 좀개구리밥 (*Lemna paucicostata* Hegelm.)에서도 유사한 양상을 보였다 (Oh 등, 2009). 그리고 카드뮴 농도의 증가에 따라 RC/CS가 뚜렷하게 감소하여 활성상태의 반응중심의 상대적 밀도가 낮아지고 있음을 알 수 있다. 광계II의 에너지 흐름을 나타내는 변수들 중에 ABS/CS는 카드뮴에 의한 통계적으로 유의한 차이는 없으나, TRo/CS와 ETo/CS는 카드뮴 농도의 증가에 따라 뚜

렷하게 감소하였으며, DIo/CS는 100  $\mu\text{M}$  카드뮴 처리구에서 증가하였다 (Table 2). 즉, 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$ 의 카드뮴 처리구에서 RC/CS가 대조구에 비해 각각 69.8%와 61.0%로 감소하였다. ETo/CS도 카드뮴 농도가 증가할수록 감소하여 광계II에 포획된 에너지의 대부분이 전자전달로 사용되지 않고 버려지고 있음을 알 수 있으며, 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$  카드뮴 처리구에서 각각 77.3%와 48.5%로 크게 감소하였다. 이에 반해 DIo/CS는 50  $\mu\text{M}$  카드뮴 처리에서는 변화가 없으나, 100  $\mu\text{M}$  카드뮴 처리구에서는 대조구에 비해 1.37배 증가하였다. 카드뮴 스트레스 하에 놓여있는 은행이끼에서 광계II에서의 에너지 흐름을 pipeline model로 나타내면 Fig. 7과 같다. 카드뮴 농도가 증가할수록 광계II에 포획된 에너지의 상당 부분이 전자전달로 사용되지 않고 버려지고 있으며 활성상태의 반응중심의 밀도도 감소하여 카드뮴에 의한 광계II의 저해효과를 뚜렷하게 알 수 있다.

이상의 연구결과로부터 은행이끼는 현재 지표식물로 널리 활용되고 있는 개구리밥(*Spirodela polyrrhiza*

**Fig. 7.** The leaf model showing the phenomenological energy fluxes in PS II of *Ricciocarpus natans* (L.) Corda under cadmium( $\text{Cd}^{2+}$ ) stress for 3 days. Active and inactive RCs are shown as open and filled black circles, respectively. For more details, see material and methods.



(L.) Schleid.)이나 좁개구리밥 등과 마찬가지로 크기가 작고 배양환경을 인위적으로 조절하기가 쉬운 뿐만 아니라 카드뮴의 영향을 받기 때문에 실험실에서 카드뮴 독성을 진단하는데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 보인다. 그리고 형광이미지의 분석은 황백화 현상 등 가시적인 징후가 발생되기 전에 신속하게 카드뮴 독성을 평가할 수 있고 시각적 표시가 가능하나 객관적 평가에 한계가 있음을 알 수 있다. 그렇지만 O-J-I-P 분석을 통해 산출된 Fm, Fv/Fo, Sm, SFIabs, PIabs, ETo/CS, Mo와 Kn 등은 카드뮴 스트레스 하에서 뚜렷하게 변화하여 카드뮴 스트레스에 대한 식물의 생리적 상태를 정량적으로 진단하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 보인다.

#### 4. 결 론

본 연구는 선態식물이면서 부유성 소식물체인 은행이끼(*Ricciocarpus natans* (L.) Corda)의 카드뮴에 대한 반응을 엽록소형광 이미지분석과 O-J-I-P 분석을 통하여 조사하고 엽록소형광 변수들의 환경지표로서의 활용가능성을 살펴보았다. Fv/Fm 이미지는 카드뮴 처리 후 48시간이 경과하면서부터 변하기 시작하였다. 그리고  $\Phi_{PSII}$ 와  $Q_P$ 는 10  $\mu$ M의 저농도에서도 그 변화가 감지되었다. O-J-I-P 곡선의 패턴을 보면, 카드뮴 농도가 증가할수록 J, I, P 값이 큰 폭으로 떨어지고 있다. O-J-I-P 분석으로부터 산출된 형광변수들 중에 Fm, Fv/Fo, Sm, SFIabs, PIabs, ETo/CS 값의 감소와 Mo, Kn 값의 증가는 다른 형광변수들에 비해 뚜렷하게 나타났다. 카드뮴 스트레스에 의한 peroxidase와 catalase 등 항산화효소의 활성을 살펴보면, 카드뮴 농도가 증가할수록 peroxidase 활성은 감소하였으며, catalase 활성은 증가하는 패턴을 보였다. 결론적으로 은행이끼는 카드뮴에 민감하게 반응하여 환경지표 식물로 활용이 가능할 것으로 보이며, 스트레스 하에서 뚜렷하게 증가하거나 감소하는 형광변수들(Fm, Fv/Fo, Sm, SFIabs, PIabs, ETo/CS, Mo, Kn)을 이용하여 카드뮴 스트레스에 대한 식물의 생리적 상태를 정량적으로 진단할 수 있을 것으로 보인다.

#### 감사의 글

이 논문은 2007년 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행되었으며(KRF-2007-532-D00010), 이에 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

- Abu-Muriefah, S. S., 2008, Growth parameters and elemental status of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings in response to cadmium accumulation, *Int. J. Agric. Biol.*, 10, 261-266.
- Alscher, R. G., Hess, J. L., 1993, Antioxidants in higher plants, CRC Press, Boca Raton, 1-174.
- An, Y. J., Nam, S. H., Lee, J. K., 2007, Domestic test species for aquatic toxicity assessment in Korea, *Korean J. Limnol.*, 40(1), 1-13 (in Korean).
- 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.
- Baryla, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C., Havaux, M., 2001, Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth, *Planta*, 212, 696-709.
- Chollet, R., 1993, Screening inhibitors (antimetabolites) of the biosynthesis or function of amino acids or vitamins with *Lemna* assay, in: Böger P., Sandmann G. (eds.), Target assay of modern herbicides and related phytotoxicity compounds, Lewis, London, UK, 143-149.
- Chugh, L. K., Sawhney, S. K., 1999, Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium, *Plant Physiol. Biochem.*, 37, 297-303.
- Ekmekci, Y., Tanyolac, D., Ayhan, B., 2008, Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars, *J. Plant Physiol.*, 165, 600-611.
- Foyer, C. H., Lelandais, M., Edwards, E. A., Mullineaux, P. M., 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,

- American Society of Plant Physiologists, Rockville, 131-144.
- Govindjee, 1995, Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence, *Aust. J. Plant Physiol.*, 22, 131-160.
- Gzyl, J., Rymer, K., Gwóźdz, E. A., 2009, Differential response of antioxidant enzymes to cadmium stress in tolerant and sensitive cell line of cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Acta Biochim. Pol.*, 56(4), 723-727.
- Inze, D., Van Montagu, M., 1995, Oxidative stress in plants, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6, 153-158.
- Jarvis, S. C., Jones, L. H. P., Hopper, M. J., 1976, Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots, *Plant Soil*, 44, 179-191.
- Kahle, H., 1993, Response of roots of trees to heavy metals, *Environ. Exp. Bot.*, 33(1), 99-119.
- Kelly, J. M., Parker, G. R., McFee, W. W., 1979, Heavy metal accumulation and growth of seedlings of five forest species as influenced by soil cadmium level, *J. Environ. Qual.*, 8, 361-364.
- Krupa, Z., Moniak, M., 1998, The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity, *Plant Sci.*, 138, 149-156.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>, *Nature*, 227, 680-685.
- Mahmood, S., Farzana, K., Haq, M. Z. U., Ahmad, S., Raiz, F., Ullah, A., 2007, Biochemical responses of *Pisum sativum* L. under cadmium and mercury regimes, *J. Chem. Soc. Pak.*, 29(4), 379-382.
- Mallick, A., Mohn, F. H., 2003, Use of chlorophyll fluorescence in metal stress research: a case study with green microalga *Scenedesmus*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55, 64-69.
- Nedbal, L., Soukupová, J., Whitmarsh, J., Trtílek, M., 2000, Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality, *Photosynthetica*, 38(4), 571-579.
- Nedbal, L., Whitmarsh, J., 2004, Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits, in: Papageorgiu, G., Govindjee, (eds.), *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*, Dordrecht, The Netherlands: Springer, 389-407.
- Nriagu, J. O., Panyina, J. M., 1988, Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature*, 333, 134-139.
- Oh, S. J., Zhin, K. L., Koh, S. C., 2009, Characterization of Chl a fluorescence of hydrophytes under cadmium stress, *J. Environ. Sci.*, 18(12), 1361-1368 (in Korean).
- Padmaja, K., Parsad, D. D. K., Parsad, A. R. K., 1990, Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedling by cadmium acetate, *Photosynthetica*, 24, 399-404.
- Prasad, M. N. V., 1995, Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.*, 35(4), 525-545.
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ommrod, D. P., 1996, Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.*, 110, 125-136.
- Sigfridsson, K. G. V., Bernat, G., Mamedov, F., Styring, S., 2004, Molecular interference of Cd<sup>2+</sup> with photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1659, 19-31.
- Srivastava, A., Guissé, B., Greppin, H., Strasser, R. J., 1997, Regulation of antenna structure and electron transport in PS II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1320, 95-106.
- Stirbet, A., Govindjee, Strasser, B. J., Strasser, R. J., 1998, Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: Modelling and numerical simulation, *J. Theor. Biol.*, 193, 131-151.
- Stobart, A. K., Griffiths, W. T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R. P., 1985, The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley, *Physiol. Plant.*, 63, 293-298.
- Strasser, B. J., Strasser, R. J., 1995, Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test, in: Mathis, P. (ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Kluwer Academic, Dordrecht, 977-980.
- Strasser, R. J., Govindjee, 1992, The F<sub>o</sub> and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae, in: Argyroudi-Akoyunoglou, J. H. (ed.), *Regulation of Chloroplast Biogenesis*, Plenum Press, New York, 423-426.

- Woodbury, W., Spencer, A. K., Sthamann, M. A., 1971, An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzyme, *Anal. Biochem.*, 44, 301-305.
- Zheng, G., Lv, H. P., Gao, S., Wang, S. R., 2010, Effects of cadmium on growth and antioxidant responses in *Glycyrrhiza uralensis* seedlings, *Plant Soil Environ.*, 56(11), 508-515.