

## 고선량 감마선을 조사한 벼에서 SOD isoenzyme들의 유전자 발현 및 효소활성

채효석 · 김진홍 · 정병엽\* · 김재성 · 위승곤 · 백명화 · 조재영<sup>1</sup>

한국원자력연구소 방사선연구원 · 방사선이용연구부, <sup>1</sup>전북대학교 · 응용생명공학부

Received November 28, 2005 / Accepted December 27, 2005

**Expression of Superoxide Dismutase Isoenzyme Genes and Enzyme Activities in Rice Irradiated with a High-Dose Gamma Ray.** Hyo Seok Chae, Jin-Hong Kim, Byung Yeoup Chung\*, Jae-Sung Kim, Seung Gon Wi, Myung Hwa Baek and Jae-Young Cho<sup>1</sup>. *Division of Radiation Application Research, Advanced Radiation Technology Institute (ARTI), Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI), Jeongeup 580-185, Korea, <sup>1</sup>Division of Biological Resources Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea* – We investigated relations between physiological damages and gene expression and enzyme activities of superoxide dismutase (SOD) isoenzymes in leaves of rice (*Oryza sativa* L. cv. Ilpoombyeon) plants irradiated with a high-dose gamma-ray. Gamma-irradiation with 500 Gy caused significant decreases in the contents of protein, chlorophyll and carotenoid in the rice leaves by 24 h, especially reducing the chlorophyll contents up to 26% relative to the control. In contrast, gene expressions of SOD isoenzymes were kept higher in the irradiated leaves until 24 h after the irradiation than in the control and they started to noticeably decrease at 48 h, finally being lower in the irradiated leaves at 72 h than in the control. In the case of enzyme activities of SOD isoenzymes, some CuZn-SOD isoenzymes showed slightly increased activities until 48 h after the irradiation but at 72 h, all isoenzyme activities markedly decreased in the irradiated leaves below the control levels. In conclusion, 500 Gy gamma-irradiation used in the current study caused decreases in the contents of protein, chlorophyll and carotenoid as symptoms for physiological damages. Although such physiological damages were not directly related to the gene expressions and enzyme activities of SOD isoenzymes until 24 h after the irradiation, the damages at 72 h were reasonably attributable to their reduction.

**Key words** – Superoxide dismutase, gamma-radiation, chlorophyll, carotenoid

활성산소는 일반적으로 산소 라디칼 및 이것으로부터 파생된 여러 가지 산소 화합물들을 통칭하며 강한 산화력을 가지고 있어 생체 내에 지질 과산화, 세포막 및 단백질 분해, DNA 합성 저해, 광합성 억제, 엽록소 파괴, 노화 촉진 등의 생리적 장애 및 세포 사멸을 유발한다[1,2]. 하지만 식물은 활성산소에 대한 보호기작으로 효소/비효소적 방어시스템을 가지고 있어 정상적인 생육환경에서는 활성산소에 의한 피해를 최소화할 수 있다[1,3]. 효소적 방어시스템은 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), 그리고 ascorbate peroxidase (APX) 등이 참여하여 활성산소 cascade 반응에서 가장 중요한  $\cdot O_2$ 와  $H_2O_2$ 를 소거한다[1,3]. 특히 SOD는 세포내 다양한 위치에서 활성산소 cascade 반응의 일차적 활성산소인  $\cdot O_2$ 를 소거하고  $H_2O_2$ 와의 반응에 의한  $\cdot OH$ 의 생성을 막아 활성산소에 의한 식물세포의 산화손상을 예방한다[3]. SOD는 metal cofactor에 따라 CuZn-SOD, Mn-SOD 그리고 Fe-SOD로 구분되는데 식물의 경우 일반적으로 CuZn-SOD는 엽록체와 세포질, 페록시좀 또는 마이크로바디라고 하는 세포내 소기관에[8,30], Mn-SOD는 미토콘

드리아에 그리고 Fe-SOD는 엽록체에 존재한다[5,6].

SOD 효소활성은 isoenzyme 수준에서 일찍부터 연구가 되어왔으며 많은 식물종에서 isoenzyme들이 규명되어 왔다. 산화스트레스 조건에서 isoenzyme들의 차별적 손상에 관한 연구결과들은 단백질 및 효소활성의 측면에서 주로 보고되고 있다[9,12,16,21,22]. 반면에 isoenzyme의 유전자 수준에서의 발현연구는 매우 제한적이었다. 그것은 각 식물종마다의 isoenzyme 유전자들이 모두 밝혀져 있지 않았기 때문이며 상호간 높은 유사성으로 분석이 어려웠기 때문이다. 하지만 최근에 벼에서 유전자 서열이 규명되고 대부분의 SOD isoenzyme들의 cDNA 서열이 밝혀지면서 isoenzyme 유전자의 차별적 발현에 대한 연구가 시작되고 있다[13-15]. Kim 등 [14,16]은 저선량방사선과 염스트레스 하에서 SOD isoenzyme의 유전자 발현을 처음으로 보고하였으며 특히 염스트레스 하에서 SOD isoenzyme들이 차별적으로 발현됨을 밝혔다[16].

이온화 방사선인 감마선은 고선량으로 조사될 경우 자외선처럼 식물세포와 조직에 비가역적 손상을 유발하여 식물체를 고사시킨다[10,29]. 이온화 방사선의 이러한 효과는 세포속에 존재하는 물 분해를 통해 생성되는 활성산소에 기인하는 것으로 알려져 있다[10,25,26,32]. 따라서 세포내 활성산소 보호기작인 효소/비효소적 방어시스템의 활성이 식물체의 방사선 산화스트레스에 중요한 결정요인이 될 수 있다.

### \*Corresponding author

Tel : +82-63-570-3331, Fax : +82-63-570-3339

E-mail : bychung@kaeri.re.kr

일반적으로 고선량 방사선을 조사할 경우 식물체의 효소/비효소적 방어시스템은 손상되어 생성된 활성산소를 적정수준으로 조절하지 못하는 것으로 알려져 있다[21]. 이때문에 항산화제인 비타민 C, E와 β-카로틴을 첨가한 배지에서 자란 동물세포는 대조구보다 높은 방사선 저항성을 보였으며[20], 저선량으로 SOD, APX, POD, CAT 등의 효소활성을 높인 식물체의 경우 후속 고선량 조사에 대한 저항성이 증가됨이 보고되어 있다[15,17-19,23,32]. 그러나 생체에 고선량 조사 후 단백질 수준에서 항산화 효소활성들에 대한 연구가 많이 축적된데 반해[11,21,27], 유전자 수준의 발현은 거의 조사가 이루어지지 않았으며 특히 isoenzyme 수준에서의 단백질 효소활성 및 유전자 발현은 연구된 적이 없다. 하지만 방사선에 대한 식물체의 효소적 방어시스템의 변화에 대한 연구가 식물체의 방사선 반응을 결정짓는 중요한 요소가 됨을 고려할 때 저선량 조사 후 항산화 효소 유전자 발현을 isoenzyme 수준에서 보여준 최근의 연구결과[14]의 연장선상에서 고선량에 대한 항산화 isoenzyme 유전자발현 및 단백질 활성에 대한 조사는 방사선의 식물작용 이해와 방사선 또는 산화스트레스 내성 식물의 개발에 매우 중요하다.

따라서 본 연구에서는 벼 식물체에 고선량 조사 후 단백질과 엽록소 및 카로테노이드 함량의 변화로 손상의 정도를 측정하는 한편 대표적인 항산화 효소인 SOD의 단백질 활성 및 유전자 발현을 isoenzyme 수준에서 시간별로 분석하여 고선량에 의한 벼 식물체의 손상과 SOD isoenzyme의 활성 및 유전자 발현과의 관계를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 방사선 조사

본 연구의 공시재료로는 일품벼를 식물 배양기에서 14시간의 광주기(광세기 330 μmol<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>)와 28/20℃(낮/밤)의 온도 주기를 가지면서 30일간 생육한 식물체를 이용하였다. 방사선 조사는 한국원자력연구소에서 보유중인 고준위 감마선 조사시설을 이용하여 500 Gy 수준으로 10분간 식물체에 직접 감마선을 조사하였다(<sup>60</sup>Co, 약 150 TBq 용량, Atomic Energy of Canada Limited사, Canada). 방사선 조사 후 6, 12, 24, 48, 72 h에 끝부분을 3~5 cm 정도 제거한 신선한 잎을 채취하여 즉시 액체질소에서 얼린 후 -70℃에 보관하였다.

### RNA 분리와 SOD isoenzyme 유전자의 reverse transcription (RT)-PCR

RT-PCR 분석을 위해 사용한 RNA는 벼 잎을 액체질소에 마쇄한 뒤 0.1 g씩 분주하여 Trizol (Invitrogen사, Carlsbad, CA, USA)을 사용해 추출하였다. cDNA 합성은 Accupower RT Premix (Bioneer사, Daejeon, Korea)에 RNA 1 μg과 0.5 μg의 anchored oligo(dT)<sub>18</sub>V primer (Bioneer사, Daejeon,

Korea)을 넣고 42℃에서 60분간 thermal cycler (TP600, Takara사, Shiga, Japan)를 이용해 반응시켰다. PCR 반응은 합성된 cDNA 3 μl, 2×PCR premix 10 μl (Perfect Premix ver 2.1, Takara Korea Biomedical사, Seoul, Korea), 10 pmol로 희석된 forward와 reverse primer 각각 2 μl, 그리고 증류수 3 μl를 첨가한 후 94℃에서 5분간 predenaturation을 하였고, denaturation은 94℃에서 45초, annealing은 54℃에서 60초 또는 58℃에서 45초, polymerization은 72℃에서 90초의 과정을 24 또는 30회 반복한 뒤 extension은 72℃에서 10분간 수행하였다. 반응 후 PCR 증폭산물은 ethidium bromide (EtBr)로 염색된 1% agarose 겔 상에서 확인하였다. PCR 반응에 사용된 각 isoenzyme에 특이적인 forward와 reverse primer들은 Table 1에 제시된 pCuZn-SOD와 Mn-SOD2를 제외하고는 Kim 등[14]이 기술한 것과 동일한 염기서열을 사용하였다.

### Native-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 이용한 SOD isoenzyme 활성 분석

효소는 벼 잎 0.1 g을 액체질소에 얼려 막자사발에서 마쇄한 후 Saruyama와 Tanida [28]가 기술한 방법에 따라 50 mM KPi buffer, 1% Triton X-100, 그리고 7 mM β-mercaptoethanol로 구성된 extraction buffer로 추출하였다. 이 효소 추출액은 30 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% (w/v) glycerol, 0.005% (w/v) bromophenol blue로 구성된 sample buffer와 동량으로 섞은 뒤 Beauchamp과 Fridovich [4]의 방법에 따라 SOD 활성을 분석하기 위해 10% non-denaturing gel 상에 load하고 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 50 mM KPi buffer (pH 7.8), 2.8×10<sup>-5</sup> M riboflavin, 0.028 M N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 2.45×10<sup>-3</sup> M nitroblue tetrazolium (NBT)을 포함하는 반응액

Table 1. Gene-specific primer pairs for SOD isoenzyme genes

Isoenzyme	Sequence (5'-3')
cCuZn-SOD1	(F) GAGATTCCAAACCAGCAGGA
	(R) TTGTAGTGTGGCCAGTTGA
cCuZn-SOD2	(F) ACAGCCAGATCCCCCTTACT
	(R) GCAAAGTGCACACTGGTCAT
pCuZn-SOD	(F) TTTTCCAGTCCCCTTCTCT
	(R) AGCCGTGAAGTCCAGGAGTA
Fe-SOD	(F) CTTGATGCCCTGGAAACCTTA
	(R) GCCAGACCCAAAAGTGATA
Mn-SOD1	(F) GGAGGCCATGTCAATCATTC
	(R) CACAAGGTCCAGAAGTGCAA
Mn-SOD2	(F) ATGCTGGGCAGTTTACCAAC
	(R) CACAAGTCTGCGAGATCCA

All primer sequences were obtained from Kim *et al.* [14] except pCuZn-SOD and Mn-SOD2.

에 30분간 염색한 후 light box 위에서 SOD band가 가장 선명해 질 때까지 빛을 주었다.

**단백질 정량**

벼 잎 0.1 g을 액체질소에 얼려 막자사발에서 마쇄한 후 50 mM KPi buffer, 1 % Triton X-100, 그리고 7 mM β-mercaptoethanol로 구성된 extraction buffer로 단백질을 추출하였다. 전체 단백질 함량은 이 추출물을 4℃, 10,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 따서 측정하였으며 Bradford의 방법[7]에 기초한 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories사, USA)를 이용하였다.

**엽록소와 카로테노이드 함량 측정**

엽록소와 카로테노이드 함량은 Lichtenthaler 방법[24]을 사용하여 측정하였다. 액체질소에 마쇄된 벼 잎 0.1 g이 분주된 E-tube에 100% 아세톤을 1 ml 넣은 후 암조건, 4℃에서 한 시간 동안 흔들어 주면서 색소를 추출하였다. 엽록소와 카로테노이드 함량은 이 추출물을 4℃, 10,000×g에서 원심분리하여 얻은 상층액의 661.6, 644.8 그리고 470 nm에서의 흡광도 값을 이용해 다음과 같이 구하였다.

$$\begin{aligned} \text{엽록소 } a &= 11.24 \times A_{661.6} - 2.04 \times A_{644.8} \\ \text{엽록소 } b &= 21.13 \times A_{644.8} - 4.19 \times A_{661.6} \\ \text{엽록소 } a+b &= 18.09 \times A_{644.8} + 7.05 \times A_{661.6} \\ \text{카로테노이드} &= (1000 \times A_{470} - 1.90 \times \text{엽록소 } a - 63.14 \times \text{엽록소 } b) / 214 \end{aligned}$$

**결과 및 고찰**

**고선량 감마선 조사 후 벼 잎의 단백질과 엽록소 및 카로테노이드 함량 변화**

고선량 감마선에 의한 벼 잎의 생리적 손상이 단백질, 엽록소, 카로테노이드의 함량 변화를 통해 조사되었다(Fig. 1). 단백질은 감마선 조사후 6 h에서 대조구와 조사구 사이에 유의적인 차이가 없었지만 24 h에는 조사구에서 18%가 감소하였으며(Fig. 1A), 이러한 현상은 이후에도 지속되었다(자료 미제시). 이러한 결과는 광합성과 항산화제로서 역할을 하는 엽록소와 카로테노이드에서도 관찰되었다. 두 색소들은 감마선 조사후 6 h에서부터 대조구와 차이를 보였는데 24 h에서 엽록소는 대조구에 비해 26%, 카로테노이드는 15%가 감소하였다(Fig. 1B, C). 그러나 Kim 등[15]은 4~16 Gy의 감마선 조사후 24 h에서 고추 잎의 카로테노이드 함량이 선량의 존적으로 감소한 반면 엽록소는 크게 영향을 받지 않았음을 보고하였다. 이것은 본 실험에 사용된 500 Gy의 감마선량이 엽록소를 파괴할 정도의 높은 선량이며 단백질 감소와 더불어 고려할 때 광합성능의 실질적인 손상을 초래하였음을 의미한다.

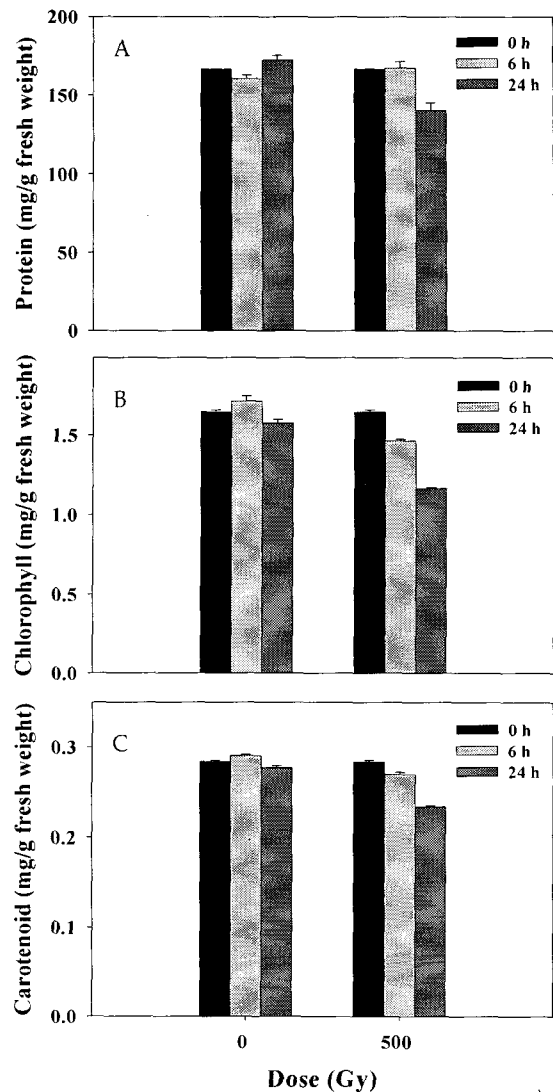


Fig. 1. Changes in the protein (A), chlorophyll (B) and carotenoid (C) contents of rice leaves after gamma-irradiation. Bars represent means±SE of triplicate experiments.

**고선량 감마선에 의한 SOD isoenzyme 유전자의 발현 변화**

Fig. 1에서 500 Gy의 고선량 감마선 조사가 24 h 이내에 벼 잎에 생리적 손상을 초래함을 확인하였다. 이러한 효과는 감마선의 일차적인 직접반응이외에 세포속에서 물분해를 통해 생성된 활성산소에 의한 이차반응에 기인하는 것으로 [10,25,26,32], 세포손상의 정도는 내재적 활성산소 보호기작인 효소/비효소적 방어시스템의 활성화에 의존적일 수 있다. 실제로 Kim 등[15]은 2~16 Gy의 감마선 조사후 고추 잎에서 SOD, APX의 활성과 ascorbate의 함량이 증가함을 보고하였다. 이러한 항산화능의 증가는 이후 광저해와 UV-B 스트레스에 대한 저항성의 증가와 관련있는 것으로 생각되었다.

따라서 본 실험에서는 벼 잎에 생리적 손상을 초래하는 500 Gy 고선량 감마선이 주요 항산화 효소인 SOD의 유전자

발현에 어떤 영향을 미치는지 isoenzyme 수준에서 조사하였다. Fig. 2에서 전체적인 발현량은 감마선 조사후 6 h에 조사구의 isoenzyme들이 대조구보다 높은 발현량을 보였으며 이러한 효과는 cCuZn-SOD1을 제외하고 24 h까지 지속되었다. 그 이후 조사구에서는 모든 isoenzyme들의 발현량이 현저히 감소하기 시작하여 72 h에서는 오히려 대조구보다 낮아졌다. 전반적으로 대조구에서는 일간차이로 인해 isoenzyme의 발현이 복잡한 양상을 보이는데 반해 조사구에서는 6 h 이후로 시간에 따라 지속적으로 발현량이 감소하였다. 따라서 벼 식물체에 500 Gy의 감마선을 조사할 때 잎의 단백질, 엽록소, 그리고 카로테노이드 함량이 감소하는 동시에 SOD의 유전자 발현도 저하됨을 알 수 있다(Fig. 1과 2). 그러나 벼 잎의 생리적 손상이 24 h 이내에 확인되는 것과 달리 SOD 유전자의 발현은 24 h까지 대조구보다 높게 유지되다가 48 h 이후에 감소하였으므로 적어도 SOD 유전자 발현의 감소가 벼 잎의 초기 생리적 손상에 기여한 것으로 생각되지는 않는다. 그렇지만 Kim 등[16]이 4 Gy의 저선량 감마선을 조사한 벼에서 pCuZn-SOD를 제외한 SOD 유전자들의 발현에 변화가 없었다는 보고와 달리 본 연구에 사용된 500 Gy의 고선량 감마선은 모든 SOD 유전자들의 발현을 현저히 감소시켰으므로 72 h 부터의 생리적 손상과는 연관될 가능성을 배제할 수 없다.

**고선량 감마선 조사 후 SOD isoenzyme 효소 활성의 변화**

고선량 감마선 조사후 SOD isoenzyme들의 유전자 발현이 감소하였지만 이러한 유전자 수준의 변화가 반드시 단백

질 함량 또는 효소활성의 변화를 의미하는 것은 아니다[16].

따라서 고선량 감마선 조사에 따른 벼 잎의 생리적 손상에 각 SOD isoenzyme이 얼마나 연관되는 지 확인하기 위해서는 단백질 수준의 효소활성을 조사할 필요가 있다. 이를 위해 벼 식물체에 500 Gy의 고선량 감마선을 조사한 후 잎조직의 SOD isoenzyme 활성변화를 native gel 상에서 분석하였다(Fig. 3). 그 결과 조사구의 일부 CuZn-SOD isoenzyme들(band 2와 3)의 활성이 감마선 조사후 48 h까지 대조구보다 높았지만 72 h에는 모든 isoenzyme들의 활성이 감소하였다. 이러한 결과는 500 Gy의 고선량 감마선 조사후 적어도 72 h부터는 SOD isoenzyme들의 유전자 발현과 효소활성의 변화가 상호연관이 있으며 벼 잎의 생리적 손상에 대한 원인이 될 수 있음을 의미한다. 유사하게 Kwon 등[21]은 고추 식물체에 50 Gy의 감마선 조사후 24 h에 잎조직의 SOD와 POD의 활성이 크게 증가하였으나 5일째에는 오히려 현저히 감소함을 보고하였다. 반면에 상대적으로 낮은 선량인 10 Gy가 조사될 때 효소활성은 5일 이후에도 대조구보다 높게 유지되었으며, Kim 등[15]의 보고에 따르면 2~16 Gy의 감마선을 조사한 후 고추 잎에서 SOD, APX의 활성과 ascorbate의 함량이 증가하였다.

결론적으로 본 연구에 사용된 500 Gy의 고선량 감마선은 단백질, 엽록소, 그리고 카로테노이드 함량의 감소를 초래하며, 조사후 초기단계에 일시적으로 SOD isoenzyme들의 유전자 발현을 증가시키지만 72 h 이후에는 유전자 발현과 효소활성을 동시에 감소시키면서 산화스트레스에 의한 생리적 손상을 유도하는 것으로 생각된다. 그리고 고선량 감마선 조사후 초기단계에 isoenzyme들의 유전자 발현증가는 일부의

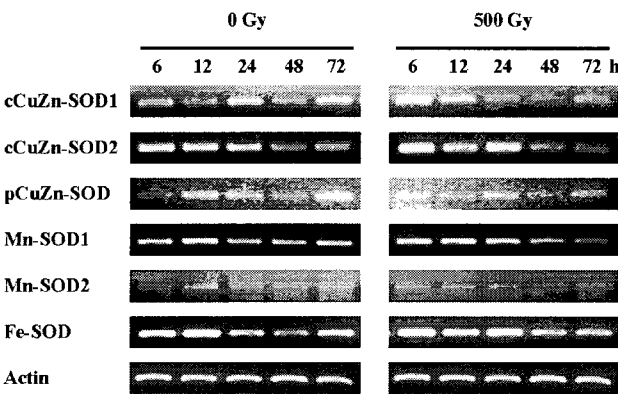


Fig. 2. Expression of SOD isoenzyme genes in rice leaves after gamma-irradiation. For the RT, one microgram total RNA was reverse transcribed for 60 min at 42°C using 0.5 µg anchored oligo (dT)<sub>18</sub>V primers. The subsequent PCR was performed as follows: denaturation at 94°C for 5 min, 24 cycle reactions of 94°C (45 s) - 58°C (45 s) - 72°C (90 s) for all genes except 30 of 94°C (45 s) - 54°C (60 s) - 72°C (90 s) for pCuZn-SOD and Mn-SOD2 genes, and extension at 72°C for 7 min. Actin was amplified as an internal standard.

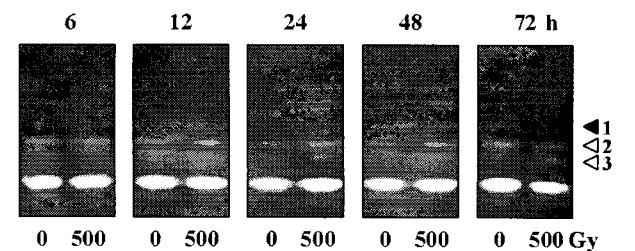


Fig. 3. SOD isoenzyme activities in rice leaves after gamma-irradiation. Enzyme extracts (175 µg protein per lane) were loaded on a 10% non-denaturing polyacrylamide gel. After the native PAGE, the gel was incubated in the staining solution for 30 min, which contained 50 mM KPi buffer (pH 7.8), 0.028 M TEMED, 2.8×10<sup>-5</sup> M riboflavin and 2.45×10<sup>-3</sup> M NBT. Isoenzyme bands were visualized by illuminating the gel on a light box for 10-15 min. The gel image was taken when the bands reached the best resolution. All the bands except for the indicated band (black arrow head) are CuZn-SOD as characterized by the sensitivity to the inhibitors, KCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[31].

경우 효소활성의 증가와 연관성이 있는 것으로 보이나 각 isoenzyme에 따른 차별적 영향이 존재하므로 좀 더 세부적인 연구가 필요하다.

### 요 약

일품벼(*Oryza sativa* L. cv. Ilpoombye)에 고선량 감마선을 조사한 후 벼 잎의 생리적 손상과 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD)의 isoenzyme 수준에서의 유전자 발현 및 효소활성 변화와의 연관성을 조사하였다. 500 Gy의 감마선 조사는 24 h 이내에 벼 잎의 단백질, 엽록소, 그리고 카로테노이드의 함량을 유의적으로 감소시켰으며 특히 엽록소는 대조구에 비해 26% 이상 감소하였다. 반면에 SOD isoenzyme들의 유전자 발현은 감마선 조사 후 6 h부터 24 h까지는 전반적으로 대조구보다 높게 유지되었으나 48 h부터 현저히 감소되어 72 h에는 모든 isoenzyme들의 유전자 발현이 대조구보다 낮았다. 그러나 isoenzyme들의 효소활성은 조사구에서 일부 CuZn-SOD isoenzyme들의 경우 48 h까지 대조구보다 약간 높았지만 72 h에는 모두 현저히 감소하였다. 따라서 본 연구에 사용된 500 Gy의 고선량 감마선은 단백질, 엽록소, 그리고 카로테노이드 함량의 감소를 초래하며, 조사 후 초기단계에는 이러한 생리적 손상과 무관하게 일시적으로 SOD isoenzyme들의 유전자 발현을 증가시키지만 72 h 이후에는 유전자 발현과 효소활성을 동시에 감소시키면서 산화스트레스에 의한 생리적 손상을 유도하는 것으로 생각된다.

### 감사의 글

이 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

### 참 고 문 헌

- Allen, R. D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* **107**, 1049-1054.
- Alscher, R. G. and J. L. Hess. 1993. Antioxidants in higher plants. pp. 1-174, CRC press Inc., Boca Raton. Florida.
- Asada, K. 1996. Radical production and scavenging in the chloroplast. pp. 123-150, In N. R. Baker (ed.), *Photosynthesis and the Environments*, Dordrecht, Kluwer Acad. Publ., Boston.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 176-287.
- Bowler, C. W. Van Camp, M. Van and D. Inze. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 199-218.
- Bowler, C., M. Van and D. Inze. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 83-116.
- Bradford, M. 1976. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bueno, P., J. Varela, G. Gimenez-Gallego and L. A. del Rio. 1995. Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **108**, 1151-1160.
- Choi, S. M., S. W. Jeong, W. J. Jeong, S. Y. Kwon, W. S. Chow and Y. I. Park. 2002. Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase is a highly sensitive site in cucumber leaves chilled in the light. *Planta* **216**, 315-324.
- Dubner, D., P. Giscone, I. Jaitovich and M. Perez. 1995. Free radicals production and estimation of oxidative stress related to gamma irradiation. *Biol. Trace Elem. Res.* **47**, 265-270.
- Hardmeier, R., H. Hoeger, F. K. Susanne, A. Khoschorur and G. Lubec. 1997. Transcription and activity of antioxidant enzymes after ionizing irradiation in radiation-resistant and radiation-sensitive mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 7572-7576.
- Haythem, M., J. Moez, L. Ferid and E. A. Mohamed. 2004. Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 717-722.
- Kaminaka, H., S. Morita, H. Yokoi, T. Masmura and K. Tanaka. 1997. Molecular cloning and characterization of a cDNA for plastidic copper/zinc-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* **38**, 65-69.
- Kim, J. H., B. Y. Chung, J. S. Kim, S. G. Wi, D. H. Yang, C. H. Lee and M. C. Lee. 2004. Construction of gene-specific primers for various antioxidant isoenzyme genes and their expression in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings obtained from gamma-irradiated seeds. *J. Photosci.* **11(3)**, 115-120.
- Kim, J. H., B. Y. Chung, J. S. Kim and S. G. Wi. 2005a. Effects of in *Planta* gamma-irradiation on growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of red pepper (*Capsicum annum* L.) plants. *J. Plant Biol.* **48(1)**, 47-56.
- Kim, J. H., B. Y. Chung, M. H. Baek, S. G. Wi, D. H. Yang, M. C. Lee and J. S. Kim. 2005b. Expression of antioxidant isoenzyme genes in rice under salt stress and effects of jasmonic acid and  $\gamma$ -radiation. *Agric. Chem. Biotechnol.* **48(1)**, 1-6.
- Kim, J. S., S. K. Chae, M. H. Baek and D. H. Kim. 2000. Effects of low dose  $\gamma$ -radiation on the radiosensitivity of soybean (*Glycine max* L.) plant. *Kor. J. Environ. Agr.* **19(4)**, 324-327.
- Kim, J. S., J. K. Kim, M. H. Baek and D. H. Kim. 1999. Effects of low dose  $\gamma$ -ray on the early growth of tomato and the resistance to subsequent high dose of radiation. *J. Kor. Asso. Radiat. Prot.* **24(3)**, 123-129.
- Kim, J. S., M. H. Baek, D. H. Kim, Y. K. Lee and Y. B. Lee. 2001. Effects of low dose gamma radiation on the early growth of pepper and the resistance to subsequent high dose of radiation. *Kor. J. Environ. Biol.* **19(1)**, 71-77.
- Konopacka, M. and J. R. Wolny. 2001. Antioxidant vita-

- mins C, E and  $\beta$ -carotene reduce DNA damage before as well as after  $\gamma$ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutation Res.* **491**, 1-7.
21. Kwon, S. T., E. A. Jung and J. S. Kim. 2001. Effect of  $\gamma$ -radiation on growth and antioxidant enzyme activities in red pepper. *Kor. J. Life. Sci.* **11(6)**, 612-617.
  22. 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**, 75-85.
  23. Lee, H. Y., J. S. Kim, M. H. Baek, Y. K. Lee and D. S. Im. 2002. Effects of low dose  $\gamma$ -radiation on the growth, activities of enzymes and photosynthetic activities of gourd (*Lagenaria siceraria*). *Kor. J. Environ. Biol.* **20**, 197-204.
  24. Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol.* **148**, 350-382.
  25. Luckey, T. D. 1980. Hormesis with ionizing radiation. pp. 32-38, CRC Press Inc., Boca Ranton. Florida.
  26. Miller, M. W. 1987. Radiation hormesis in plants. *Health Phys.* **52**, 607-616.
  27. Naik, G. H., K. I. Priyadarsini, J. G. Satav, M. M. Banavalikar and D. P. Sohoni. 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochem.* **63**, 97-104.
  28. Saruyama, H. and M. Tanida. 1995. Effect of chilling on activated oxygen scavenging enzymes in low temperature-sensitive and tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* **109**, 105-113.
  29. Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **101**, 7-12.
  30. Streller, S. and G. Wingsle 1994. Pinus sylvestris L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta* **192(2)**, 195-201.
  31. Van Camp, W., D. Inze and M. Van Montagu. 1997. The regulation and function of tobacco superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 515-520.
  32. Zaka, R., C. M. Vandecasteele and M. T. Misset. 2002. Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G<sub>6</sub>PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae). *J. Exp. Bot.* **53(376)**, 1979-1987.