

봉선화(*Impatiens balsamina* L.)에 대한 pH 수준별 처리가 항산화 물질 및 관련 효소 활성에 미치는 영향

김 학 윤*

계명대학교 환경학부

Received April 8, 2005 / Accepted May 13, 2005

Effect of Simulated Acid Rain on Antioxidants and Related Enzymes in Garden Balsam (*Impatiens balsamina* L.). Hak Yoon Kim*. Faculty of Environmental Studies, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea – To investigate the effects of simulated acid rain (SAR) on growth and biochemical defense responses of plant, garden balsam (*Impatiens balsamina* L.) was subjected to four levels of SAR based on pH (5.6, 4.0, 3.0, 2.0) and placed in the growth chambers for 2 weeks. SAR drastically inhibited both height and dry weight of garden balsam. The content of total carotenoid was tended to decrease, but the level of malondialdehyde was significantly increased by SAR. As the pH levels decreased from 5.6 to 2.0, the content of dehydroascorbate and oxidized glutathione of the plant were significantly increased. The enzyme (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase etc.) activities of the plant affected by SAR were increased as the pH decreased. The results indicate that garden balsam may receive oxidative stresses by the application of SAR and by which the plant growth can be significantly retarded. A biochemical protective mechanism might be activated to nullify the oxidative stresses generated through SAR.

Key words – Antioxidants, Antioxidative enzymes, Garden balsam, Malondialdehyde, Simulated acid rain (SAR)

최근, 급속한 공업화 및 산업화로 인해 세계 여러 곳에서 산성비의 관측이 보고되고 있다. 산성비는 주로 화석연료의 사용에 의한 황산화물과 질소산화물의 대기 중 확산에 의하여 발생되며, 1974년 스코틀랜드에서 pH 2.4의 산성비를 기록한 것을 비롯하여 우리나라에서도 산성비가 자주 보고되고 있다[10].

산성비는 식물 잎의 cuticle층을 손상시켜 생체 유용성분들을 용출시키며[15], 엽육세포의 파괴로 비정상적인 생장을 초래하고[3], 각종 대사작용을 교란시켜 chlorosis 및 necrosis를 일으킨다[7].

식물에 따라서 산성비에 대한 피해는 다양하게 나타난다. 일반적으로 단자엽 식물보다 쌍자엽 식물이, 목본 식물보다 초본 식물이 산성비에 대한 감수성이 높은 것으로 알려져 있다[3,7]. 산성비에 대한 감수성 차이는 식물 종간의 형태적 특성과 생체방어능력의 차이뿐만 아니라, 산성비의 영향을 감소시킬 수 있는 식물의 pH 완충능력과 중화능력의 차이에 의해서도 다양하게 나타난다[17,23].

최근, 토마토와 콩 등 일부식물에서 산성비 처리에 의한 활성산소 생성과 이로 인한 산화스트레스의 가능성이 제기되고 있다[6,23]. 식물은 각종 스트레스로부터 생성된 활성산소를 해독하기 위한 생화학적 방어기구를 가지고 있으며, 여기에는 superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) 등의 항산화효소와 ascorbate, glutathione 등의 저분

자 물질들이 관여되어 있는 것으로 알려져 있다[2]. 따라서 이러한 식물의 생화학적 방어능력 차이에 의해서도 산성비에 대한 피해 정도가 다를 것으로 추측된다.

지금까지 산성비가 식물에 미치는 영향은 수목이나 일부 농작물에 대한 생장반응의 연구가 대부분이며[4,10], 초화류에 대한 연구는 상대적으로 적은 실정이다. 일부 초화류는 산성비에 노출되었을 경우 잎의 손상과 화색의 변화 등에 의해 관상가치 및 상품가치가 현저히 저하되는 것으로 보고되어 있다[16].

본 연구는 도시의 화단 및 꽃길 조성용으로 많이 이용되고 있는 봉선화를 대상으로 산성비에 의한 식물 피해 양상을 조사하고, 산성비 처리가 활성산소 생성에 의한 산화 스트레스를 일으키는지를 조사함과 동시에 산성비에 대한 식물의 생화학적 방어반응을 조사하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시식물

봉선화(*Impatiens balsamina* L.) 종자를 발아시킨 후, 500 g의 배양상토(N: P₂O₅: K₂O = 0.21: 0.41: 0.38)를 담은 플라스틱 포트에 1개체씩 파종하여 인공기상실에서 3주간 생육시켰다. 인공기상실 내의 온도는 낮(7시~19시)이 30°C, 밤(19시~7시)이 20°C였으며, 습도는 주야간 공히 70±5%를 유지하였다.

인공산성비 제조

인공산성비의 제조는 Singh와 Agrawal[19]의 방법에 따라

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5918, Fax : +82-53-580-5385

E-mail : hykim@kmu.ac.kr

1N H₂SO₄와 1N HNO₃를 이용하여 pH가 각각 2.0, 3.0, 4.0 인 용액을 만들어 사용하였으며, 대조구는 일반적으로 산성비의 기준이 되는 pH 5.6 용액을 제조하여 사용하였다.

산성비에 대한 생장반응

3주 동안 생육한 건전한 식물체를 대상으로 각 pH 농도별 용액을 자연 강우와 같이 식물체가 완전히 젖을 정도로 3일간격으로 처리하면서 2주 동안 생육시킨 후, 초장 및 건물중을 조사하였다.

Malondialdehyde (MDA) 및 total carotenoid 함량 측정

MDA 함량은 Heath와 Packer[7]의 방법에 따라 2주간의 산성비를 처리한 1 g의 잎을 채취하여 6 ml의 증류수를 넣어 마쇄하고, 20% trichloroacetic acid와 0.5% thiobarbituric acid로 반응시킨 후, 532 nm와 600 nm에서의 흡광도를 조사하여 그 함량을 측정하였다. Total carotenoid 함량은 Lichtenthaler [14]의 등식에 의해 분광광도계를 이용하여 470 nm, 648 nm 및 664 nm에서의 흡광도를 측정하여 함량을 조사하였다.

Ascorbic acid 및 glutathione 함량 측정

2주간의 산성비 처리한 1 g의 잎을 채취하여 10 ml의 methaphosphoric acid 용액으로 추출하고 Bolin과 Book[16]의 방법에 의해 환원형인 ascorbic acid (AsA)와 산화형인 dehydroascorbate (DHA)의 함량을 측정하였다. Glutathione 함량은 Law 등[12]의 방법에 따라 환원형 glutathione (GSH) 및 산화형 glutathione (GSSG)의 함량을 측정하였다.

항산화효소의 활성측정

2주간의 산성비 처리한 1 g의 잎을 채취하여 potassium phosphate buffer (pH 7.8)로 추출하여 활성분석에 사용하였다. SOD의 활성은 Schoner과 Krause[18]의 방법에 따라 cytochrome c의 감소를 A₅₅₀에서 측정하였으며, APX의 활성은 A₂₉₀ (2.8 mM⁻¹cm⁻¹)에서 H₂O₂에 의한 ascorbate의 산화를 조사하였다[21]. Monodehydroascotbate reductase (MDHAR)의 활성은 Hossain 등[9]의 방법에 의해 A₃₄₀ (6.2 mM⁻¹cm⁻¹)에서 NADH의 산화를 조사하였으며, dehydroascorbate reductase (DHAR)의 활성은 A₂₉₀ (2.8 mM⁻¹cm⁻¹)에서 dehydroascorbate에서 ascorbate로의 환원을 조사하는 Tanaka 등[21]의 방법에 따라 측정하였다. Glutathione reductase (GR)의 활성은 A₃₄₀ (26.6 mM⁻¹cm⁻¹)에서 NADPH의 감소량을 측정하였으며 [18], guaiacol peroxidase (GP)의 활성은 H₂O₂ 존재 하에서의 guaiacol의 산화를 A₄₇₀ (26.6 mM⁻¹cm⁻¹)에서 측정하였다[20].

통계처리

측정치에 대한 통계처리는 one-way ANOVA에 의해 분석하고, 평균은 Tukey HSD에 의한 다중비교를 하였다(5% significance levels).

결과 및 고찰

2주간의 인공산성비 제조 처리는 봉선화 식물에 극심한 가지피해와 생육억제를 초래하였다(Fig. 1). 특히 산성비의 pH가 낮을수록 피해는 심하게 나타났으며 pH 3.0 이하의 처리에 의해 암회색 또는 적갈색의 괴사 반점이 생성되었다. 이 결과는 초본식물의 경우 대부분 pH 3.5 이하에서 가지피해가 일어난다고 보고한 Lee 등[13]의 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

산성비 처리가 봉선화 생육에 미치는 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 본 실험에서 2주간 pH 3.0 및 pH 2.0의 산성비 처리는 대조구인 pH 5.6 처리에 비하여 각각 30% 및 50%의 초장 감소를 나타내었다. 이 결과는 4주간 pH 3.1의 산성비 처리에서 43%의 초장감소를 보인 들깨와 55%의 초장감소를 보인 당근식물에 비하여 생육억제가 다소 낮은 것으로 나타났다[10]. 건물중도 산성비의 pH가 낮아짐에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 특히 pH 4.0의 비교적 약한 산성비 처리에 의해 약 16%의 건물중이 감소하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 봉선화는 산성비에 의해 직접적인 생육억제의 영향을 받고 있으며, 산성비의 H⁺ 부하량이 증가함에 따라 피해가 커지는 것으로 나타났다.

식물은 여러 가지 환경스트레스에 노출되었을 때 활성산소 생성에 의한 산화스트레스를 일으키는 것으로 보고되어 있으며, 생체의 막지질은 산화스트레스에 민감하게 반응하는 부분으로 알려져 있다[8]. 본 실험에서 산성비 처리에 의한 MDA (지질과산화 산물) 함량은 pH 4.0 산성비 처리부터 증가를 나타내었으며 pH 2.0 처리에서는 pH 5.6 처리에 비하여 약 40%의 MDA 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 생체의 막지질이 산성비의 잠재적인 표적임을 시사하며, 산성비의 H⁺ 부하량 증가가 봉선화 잎에 산화스트레스를 일으키며 그로 인해 막지질의 조성이 크게 변



Fig. 1. Effect of simulated acid rain on the growth of garden balsam.

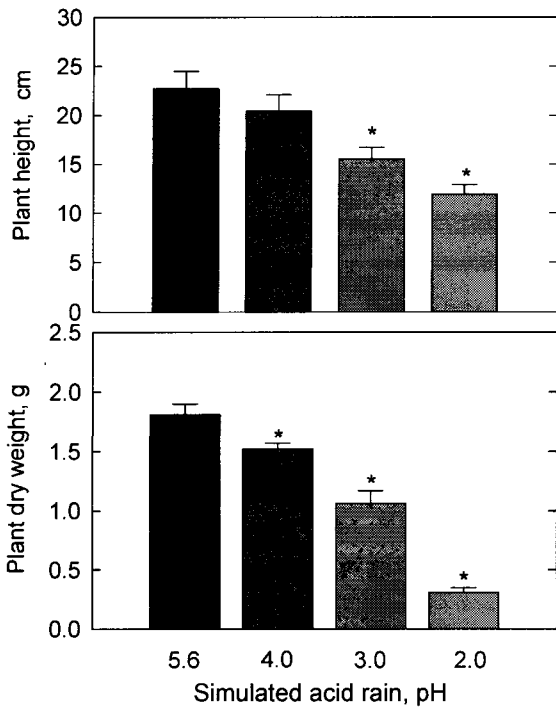


Fig. 2. Effects of simulated acid rain on height and dry weight of garden balsam. Each value is mean±SE of 10 plants. Asterisk (*) represents significant difference at $p < 0.05$.

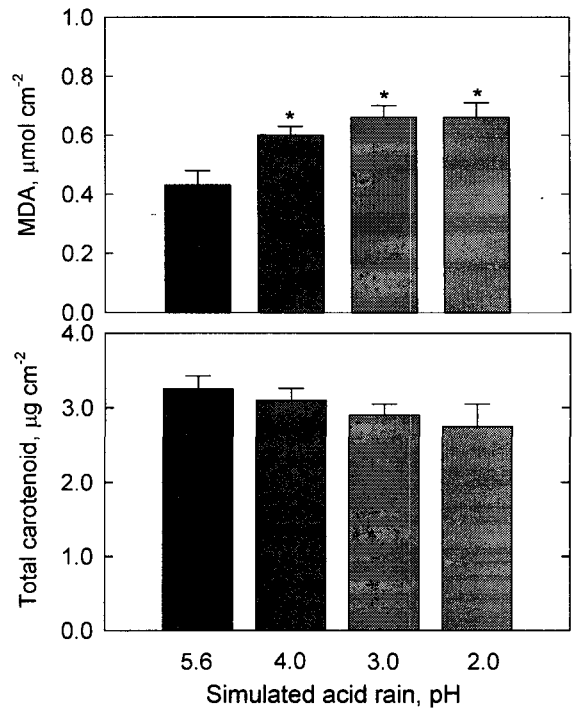


Fig. 3. Effects of simulated acid rain on contents of MDA and carotenoid of garden balsam. Each value is mean±SE of 6 plants. Asterisk (*) represents significant difference at $p < 0.05$.

화된 것으로 사료된다. Carotenoid는 산화작용으로부터 막 지질을 보호하는 항산화물질로 알려져 있다[5]. 그러나 본 실험에서 total carotenoid 함량은 산성비의 H^+ 부하량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으나 산성비 처리간에 통계학적 5% 유의성은 없었다(Fig. 3).

일반적으로 ascorbate와 glutathione은 대기오염물질이나 건조 등 환경스트레스에 의해 생성된 활성산소(O_2^- 또는 H_2O_2 등)의 무독화에 관여하는 항산화물질로 알려져 있으며[20], 일부 식물에서 항산화물질의 함량 차이는 환경스트레스에 대한 감수성 차이와 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있다[11]. 본 실험에서 산성비 처리에 의하여 환원형인 AsA 함량은 큰 변화를 나타내지 않았으나 산성비의 H^+ 부하량의 증가와 함께 산화형인 DHA 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다. 특히 pH 3.0 이하의 산성비 처리에서 pH 5.6 처리에 비해 약 2배의 DHA 함량 증가를 나타내었다(Fig. 4). 이와 같은 산화형의 증가 경향은 glutathione 함량에서도 나타났다. 환원형인 GSH의 함량은 산성비의 처리에 의해 큰 변화를 나타내지 않았으나, 산화형인 GSSG 함량은 산성비의 H^+ 부하량의 증가와 함께 크게 증가하였으며, pH 2.0처리에서는 pH 5.6 처리에 비해 약 2배의 함량 증가를 나타내었다(Fig. 4). 이와 같은 산화형 항산화 물질의 증가는 O_3 및 UV-B 등의 스트레스 실험에서도 보고되어 있으며[2,11], 산성비에 의하여 봉선화 잎에 활성산소가 생성되고 그로 인해 산화스트레스가 일어남을 시사한다.

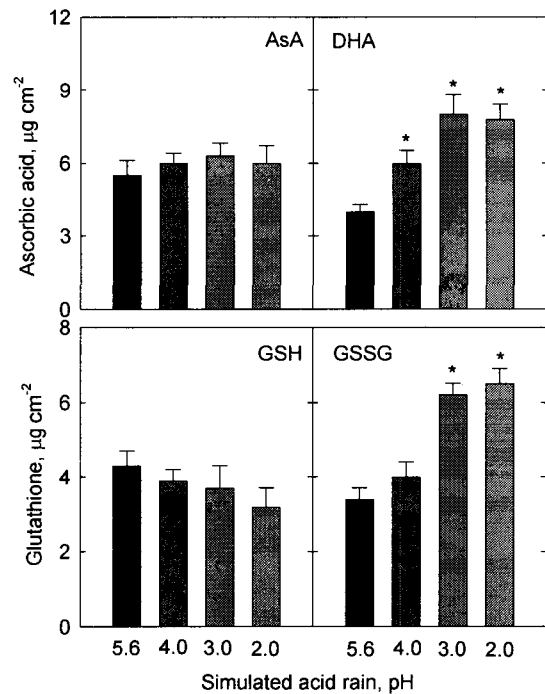


Fig. 4. Effects of simulated acid rain on contents of ascorbate and glutathione in leaves of garden balsam. Each value is mean±SE of 6 plants. Asterisk (*) represents significant difference at $p < 0.05$. AsA, ascorbic acid; DHA, dehydroascorbic acid; GSH, reduced glutathione ; GSSG, oxidized glutathione.

Table 1. Effects of simulated acid rain on activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), glutathione reductase (GR), guaiacol peroxidase (GP) in leaves of garden balsam. Each value is the mean of 6 plants. Statistically significant differences between the means are indicated by **** (p<0.05).

Enzyme activity	Simulated acid rain, pH			
	5.6	4.0	3.0	2.0
SOD, unit cm ⁻²	12±1.4	14±2.1	30±1.3*	29±1.9*
APX, μmol ⁻¹ min ⁻¹ cm ⁻²	0.40±0.03	0.46±0.04	0.71±0.03*	0.73±0.04*
DHAR, μmol ⁻¹ min ⁻¹ cm ⁻²	0.08±0.01	0.09±0.01	0.15±0.03*	0.16±0.03
MDHAR, μmol ⁻¹ min ⁻¹ cm ⁻²	0.07±0.01	0.08±0.02	0.10±0.03	0.12±0.03*
GR, μmol ⁻¹ min ⁻¹ cm ⁻²	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01*
GP, μmol ⁻¹ min ⁻¹ cm ⁻²	0.02±0.01	0.03±0.01	0.08±0.01*	0.09±0.01*

식물은 각종 환경스트레스에 의해 생체내의 산소가 superoxide radical 등의 반응성이 높은 활성산소로 변하여 생체내의 생리적 장애를 나타내는 것으로 알려져 있다[8]. 이에 대하여 식물은 SOD, APX, DHAR, 등의 항산화효소에 의해 체내에 생성된 활성산소를 효과적으로 제거하는 방어기구를 가지고 있다[2]. 본 실험에서 산성비 처리에 의한 SOD의 활성은 pH 3.0 및 pH 2.0 처리에서 pH 5.6에 비하여 약 2.5배의 증가를 나타내었는데, 산성비 처리에 의해 식물 체내에 superoxide가 생성되고 이를 무독화 시키기 위해 SOD의 활성이 증가한 것으로 사료된다(Table 1). APX의 활성도 pH 3.0 및 pH 2.0의 산성비 처리에서 pH 5.6에 비하여 약 1.8배의 증가를 보여줄 보였으며, SOD에 의해 생성된 H₂O₂의 무독화를 위하여 APX의 활성이 증가된 것으로 사료된다(Table 1). MDHAR과 GR의 활성은 산성비 처리에 의해 증가하는 경향을 보인 반면, DHAR과 GP의 활성은 산성비의 H⁺ 부하량의 증가에 따라 크게 증가하는 것으로 나타났다(Table 1). 본 실험에서 산성비의 H⁺ 부하량의 증가와 항산화효소의 활성 변화와의 정확한 관련성은 나타나지 않았지만, 대체적으로 산성비의 H⁺ 부하량이 증가함에 따라 항산화효소의 활성도 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 항산화효소의 활성 증가는 대기오염물질이나 여러 가지 환경 스트레스에 의해서도 보고되어 있으며[11,12,18,20], 산성비에 의하여 봉선화 식물에 활성산소가 생성되고 이를 무독화하기 위해 식물의 생화학적 방어반응이 작용한 것으로 사료된다.

요 약

산성비가 식물 생장에 미치는 영향과 식물의 생화학적 방어반응을 조사하고자 봉선화를 이용하여 인공 산성비(pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.6) 실험을 수행하였다.

산성비의 pH가 낮을수록 생육 피해는 심하게 나타났으며 pH 3.0 이하의 처리에 의해 잎에 암회색 또는 적갈색의 괴사반점이 생성되었다. MDA 함량은 pH 2.0 처리에서 약 40%의 증가를 나타내었다. 산성비의 H⁺ 부하량 증가에 따라 산화형인 DHA 및 GSSG의 함량이 증가하였다. 항산화효소인

SOD, APX, DHAR, GP 등의 활성도 산성비의 H⁺ 부하량의 증가에 따라 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 산성비는 봉선화 식물에 활성산소 생성에 의한 산화스트레스를 일으키며, 이를 무독화하기 위해 식물의 생화학적 방어반응이 작용하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bolin, D. W. and L. Book. 1974. Oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic acid. *Science* **106**, 451.
- Elstner, E. F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**, 73-96.
- Evans, L. S. and T. M. Curry. 1979. Differential response of plant foliage to simulated acid rain. *Amer. J. Bot.* **66**, 953-962.
- Fan, H. B. and Y. H. Wang. 2000. Effects of simulated acid rain on germination, foliar damage, chlorophyll contents and seedling growth of five hardwood species growing in China. *Forest Eco. Manage.* **126**, 321-329.
- 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.
- Gabara, B., M. Sklodowska, A. Wyrwicka, S. Glinska and M. Gapinska. 2003. Changes in the ultrastructure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves sprayed with acid rain. *Plant Sci.* **164**, 507-516.
- Haines, B., M. Stefani and F. Hendrix. 1980. Acid rain: threshold of leaf damage in eight plant species from a southern Appalachian forest succession. *Water, Air and Soil, Pollut.* **114**, 403-407.
- Heath, R. L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 189-198.
- Hossain, M. A., Y. Nakano and K. Asada. 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* **25**, 385-395.
- Huh, H. W. and M. K. Huh. 1998. The effect of simulated acid rain on the growth of important crops. *J. Kor. Environ.*

- Sci.* **7**, 123-131.
11. Kim, H. Y., K. Kobayashi, I. Nouchi and T. Yoneyana. 1996. Differential influences of UV-B radiation on antioxidants and related enzymes between rice (*Oryza sativa* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves. *Environ. Sci.* **9**, 55-63.
 12. Law, N. Y., S. A. Charles and B. Halliwell. 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and paraquat. *Biochem. J.* **210**, 899-903.
 13. Lee, J. J., G. E. Neely, S. C. Perrjean and L. C. Grothaus. 1981. Effects of simulated sulfuric acid rain on yield, growth and foliar injury of several crops. *Environ. Exp. Bot.* **21**, 171-185.
 14. Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthesis. *Methods Enzymol.* **148**, 305-352.
 15. Luxmoore, R. J., T. Gizzard and R. H. Strand. 1981. Nutrient translocation in the outer canopy and understory of an eastern deciduous forest. *For. Sic.* **27**, 505-518.
 16. Nouchi, I. 1991. Acid rain and plant damage. *J. Agr. Met.* **47**, 165-175.
 17. Pylypec, B. and R. E. Redmann. 1984. Acid-buffering capacity of foliage from boreal forest species. *Can. J. Bot.* **62**, 2650-2653.
 18. Schoner, S. and G. H. Krause. 1990. Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold accumulation in excess light. *Planta* **180**, 383-389.
 19. Singh, A. and M. Agrawal. 1996. Response of two cultivars of *Triticum aestivum* L. to simulated acid rain. *Environ. Pollut.* **91**, 161-167.
 20. Tanaka, K. and K. Sugahara. 1980. Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation. *Plant Cell Physiol.* **21**, 601-611.
 21. Tanaka, K., N. Kondo and K. Sugahara. 1982. Accumulation of hydrogen peroxide in chloroplasts of SO₂ fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* **23**, 999-1007.
 22. Teramura, A. H., L. H. Ziska and A. E. Szein. 1991. Changes in growth and photosynthetic capacity of rice with increased UV-B radiation. *Physiol. Plant.* **83**, 373-380.
 23. Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants; Protective role of exogenous polyamine. *Plant Sci.* **151**, 59-66.