

인공산성비가 만수국(*Tagetes patula* L.)의 생육 및 항산화 작용에 미치는 영향

김학윤* · 김정배

계명대학교 환경학부

(2005년 4월 13일 접수, 2005년 6월 13일 수리)

Effects of Simulated Acid Rain on Growth and Antioxidant System in French Marigold (*Tagetes patula* L.)

Hak Yoon Kim* and Jeung Bea Kim (Faculty of Environmental Studies, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea)

ABSTRACT: This study was conducted to investigate the effect of simulated acid rain (SAR) on growth and antioxidant system in french marigold (*Tagetes patula* L.). Plants were subjected to four levels of SAR (pH 5.6, 4.0, 3.0, 2.0) in the growth chambers for 2 weeks. SAR decreased both plant height and plant dry weight of french marigold. As the pH levels decreased from 5.6 to 2.0, the content of MDA highly increased linearly. The ratios of dehydroascorbate/ascorbate and oxidized glutathione/reduced glutathione were significantly increased with decreasing pH levels. The enzyme (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase etc.) activities of the plant affected by SAR were increased as the pH decreased. Based on the results, SAR caused oxidative stress in french marigold and resulted in significant reduction in plant growth. Biochemical protection responses might be activated to prevent the plant from damaging effects of oxidative stress generated in SAR.

Key Words: antioxidant system, growth, french marigold, simulated acid rain

서 론

산성비는 직·간접적으로 식물에 악영향을 미친다. 식물 잎의 cuticle층을 손상시켜 Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ 등과 같은 생체 유용성분들을 용출시키며¹⁾, 엽육세포의 파괴로 비정상적인 생장을 초래하고²⁾, 각종 대사작용을 교란시켜 chlorosis 및 necrosis를 일으킨다³⁾. 또한 산성비는 토양 산성화를 유도하고 토양 영양염류의 용탈, 토양 미생물의 성장변화 등을 조장하여 식물 생육환경을 악화시킨다⁴⁾.

산성비에 대한 식물 영향 조사는 20여 년 전부터 시작되었다. 특히 산성비는 세계적으로 주요한 작물의 성장 및 수확량 감소를 가져왔으며⁵⁾, 동부 유럽과 북아메리카 지역에서 수목의 성장 감소 및 고사현상을 일으키기는 것으로 보고되었다^{6,7)}.

일반적으로 산성비에 대한 식물 피해는 종에 따라 다양하게 나타난다. 단자엽 식물보다 쌍자엽 식물이, 목본 식물보다 초본 식물이 산성비에 대한 감수성이 높은 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 또한 산성비에 대한 감수성 차이는 식물 종간의 형태적 차이뿐만 아니라 산성비의 영향을 완화시킬 수 있는 식물의 pH 완충능력과 중화능력의 차이에 의해서도 다양하게 나타난다⁸⁾.

식물은 여러 종류의 대기오염물질, UV-B, 저온 등 환경 스트레스에 의해 생육억제의 영향을 받는다⁹⁻¹¹⁾. 최근 토마토와 콩 등 일부식물에서 산성비에 의한 활성산소 생성과 이로 인한 산화스트레스의 가능성이 제기되고 있다^{12,13)}. 식물은 각종 환경 스트레스로부터 생성된 활성산소를 해독하기 위한 생화학적 방어기구를 가지고 있으며, 여기에는 catalase, superoxide dismutase(SOD), ascorbate peroxidase(AP) 등의 항산화효소와 ascorbic acid, glutathione 등의 저분자 물질들이 관여되어 있는 것으로 알려져 있다⁹⁻¹¹⁾. 따라서 이러한 식물의 생화학적 방어능력의 차이에 의해서도 산성비에 대한 피해 정도가 다를 것으로 추측된다.

*연락처:

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

E-mail: hykim@kmu.ac.kr

지금까지 산성비가 식물에 미치는 영향은 주로 수목이나 일부 주요 농작물에 대한 생장반응의 연구가 대부분이며^{5,14,15)} 초화류에 대한 연구는 상대적으로 적은 실정이다. 일부 초화류는 산성비에 노출되었을 경우 잎의 손상과 화색의 변화 등에 의해 관상가치 및 상품가치가 현저히 저하는 되는 것으로 보고되어 있다⁴⁾.

본 연구는 도시의 화단 및 꽃길 조성용으로 많이 이용되고 있는 만수국을 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

산성비 제조

Singh와 Agrawal¹⁶⁾의 방법에 따라 1N H₂SO₄와 1N HNO₃를 이용하여 pH가 각각 2.0, 3.0, 4.0인 용액을 만들어 인공산성비로 사용하였으며, 대조구는 일반적으로 산성비의 기준인 pH 5.6 용액을 제조하여 사용하였다.

산성비에 대한 생장반응

만수국(*Tagetes patula* L.) 종자를 받아서 키친 후, 500 g의 배양상토(N: P₂O₅: K₂O = 0.21: 0.41: 0.38)를 담은 플라스틱 포트에 1개체씩 파종하여 인공기상실에서 3주 동안 생육시켰다. 인공기상실 내의 온도는 낮(7시~19시)이 30°C, 밤(19시~7시)이 20°C였으며, 습도는 주야간 공히 70±5%를 유지하였다. 산성비에 의한 생육변화를 조사하기 위하여 3주 동안 생육한 건전한 식물체를 선발하여 각 pH 농도별 용액을 자연 강우와 같이 식물체가 완전히 젖을 정도로 3일 간격으로 처리하면서 2주 동안 생육시킨 후, 초장, 엽면적 및 건물중 등을 조사하였다.

Malondialdehyde(MDA) 및 carotenoid 함량 측정

MDA 함량은 Heath와 Packer¹⁰⁾의 방법에 따라 2주간의 산성비를 처리한 1 g의 잎을 채취하여 6 ml의 증류수를 넣어 마쇄한 후, 20% trichloroacetic acid와 0.5% thiobarbituric acid로 반응시킨 후, 532 nm와 600 nm에서의 흡광도를 조사하여 그 함량을 측정하였다. Carotenoid 함량은 Lichtenthaler¹⁷⁾의 등식에 의해 분광광도계를 이용하여 470 nm, 648 nm 및 664 nm에서의 흡광도를 측정하여 함량을 조사하였다.

Ascorbic acid 및 glutathione 함량 측정

2주간의 산성비를 처리한 1 g의 잎을 채취하여 10 ml의 methaphosphoric acid 용액으로 추출하고 Bolin과 Book¹⁸⁾의 방법에 의해 환원형인 ascorbic acid(AsA)와 산화형인 dehydroascorbic acid(DHA)의 함량을 측정하였다. Glutathione 함량은 Law 등¹⁹⁾의 방법에 따라 환원형 glutathione(GSH)

및 산화형 glutathione(GSSG)의 함량을 측정하였다.

항산화효소의 활성측정

2주간의 산성비를 처리한 1 g의 잎을 채취하여 potassium phosphate buffer(pH 7.8)로 추출하여 활성분석에 사용하였다. SOD의 활성은 Schoner과 Krause²⁰⁾의 방법에 따라 cytochrome c의 감소를 A₅₅₀에서 측정하였으며, AP의 활성은 A₂₉₀(2.8 mM⁻¹cm⁻¹)에서 H₂O₂에 의한 ascorbate의 산화를 조사하였다²¹⁾. Monodehydroascorbate reductase(MDHAR)의 활성은 Hossain 등²²⁾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 등²¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. Glutathione reductase(GR)의 활성은 A₃₄₀(26.6 mM⁻¹cm⁻¹)에서 NADPH의 감소량을 측정하였으며²⁰⁾, guaiacol peroxidase(GP)의 활성은 H₂O₂ 존재 하에서의 guaiacol의 산화를 A₄₇₀(26.6 mM⁻¹cm⁻¹)에서 측정하였다²³⁾.

결과 및 고찰

일반적으로 산성비는 식물 잎에 백색 또는 갈색의 괴사반점점을 꽃에는 흰색반점의 가지피해를 나타내는 것으로 보고되어 있다²⁴⁾. 본 실험에서 2주간의 산성비처리는 만수국 식물에 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 등²⁴⁾의 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

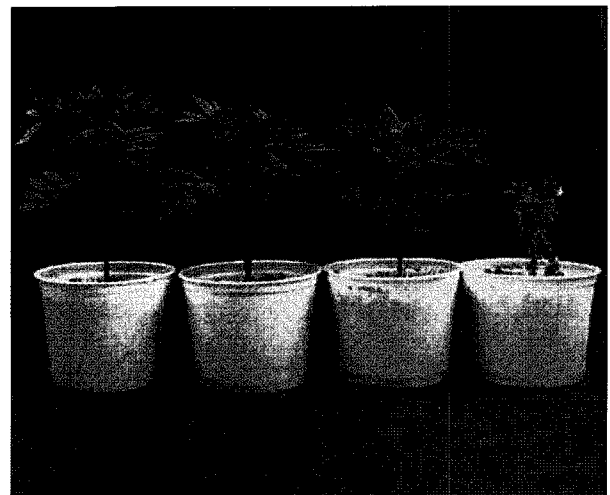


Fig. 1. Effect of simulated acid rain on the growth of french marigold.

산성비 처리가 만수국 생육에 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. 2주간 pH 4.0의 산성비 처리에 의하여 생육에 큰 변화는 나타나지 않았으나, pH 3.0 및 pH 2.0의 산성비 처리에서는 대조구인 pH 5.6 처리에 비하여 초장이 각각 20% 및 46%의 감소를 나타내었으며, 근장이 각각 8% 및 36%의 감소를 나타내어 근장에 비하여 초장의 생육이 크게 억제되는 것으로 나타났다. 이와 같이 초장과 근장의 감소 차이는 산성비의 처리가 지상부에 직접 접촉했기 때문인 것으로 사료된다. 본 실험에서의 산성비에 의한 생육억제 결과는 4주간 pH 3.1의 산성비 처리에서 43%의 초장감소를 보인 들깨와 55%의 초장감소를 보인 당근식물에 비하여 생육 피해 정도가 확연히 낮은 것으로 나타났다¹⁵⁾. 또한 엽면적 및 건물중도 pH 4.0의 산성비 처리에 의하여 큰 변화는 나타나지 않았으나, pH 3.0 및 pH 2.0의 산성비 처리에 의해 감소하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 만수국은 산성비에 의해 직접적인 생육억제의 영향을 받고 있으며, 산성비의 H⁺ 부하량이 증가함에 따라 피해가 커지는 것으로 나타났다.

모든 식물은 정도의 차이는 있지만 다양한 종류의 스트레스를 받으며 살아가고 있다. 병충해와 같은 생물학적 스트레스뿐만 아니라 대기오염물질(오존, SO_x, NO_x 등)이나 기상변화 등의 물리·화학적 스트레스를 받았을 때 생체의 막지질은 민감하게 반응하는 부분으로 알려져 있다¹⁰⁾. 본 실험에서 산성비에 의한 MDA(지질과산화 산물) 함량 변화를 조사한 결과 산성비의 pH가 낮아짐에 따라 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 pH 3.0 및 2.0의 산성비 처리에서는 대조구인 pH 5.6 처리에 비하여 약 2배 정도의 MDA 함량 증가를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 생체 막지질이 산성비의 잠재적인 표적임을 시사하며, 산성비의 H⁺ 부하량 증가가 만수국 잎에 산화스트레스를 일으키며 그로 인해 막지질의 조성이 크게 변화된 것으로 사료된다.

Carotenoid는 산화작용으로부터 막지질을 보호하는 항산화물질로 알려져 있다¹⁷⁾. 그러나 본 실험에서 carotenoid 함량은 산성비 처리에 의해 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 2).

일반적으로 생체내의 저분자 물질인 ascorbic acid와 glutathione은 여러 가지 환경 스트레스에 의해 생성된 활

성산소(O₂ 또는 H₂O₂ 등)의 무독화에 관여하는 항산화물질로 알려져 있으며¹⁹⁾, 일부 식물에서 항산화물질의 함량 차이는 환경스트레스에 대한 감수성 차이와 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 본 실험에서 산성비 처리에 의하여 환원형인 AsA 함량은 큰 변화를 나타내지 않았으나 DHA 및 total ascorbic acid(AsA + DHA) 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Table 2). 특히 산화스트레스에 의한 피해 정도를 나타내는 DHA/AsA의 비율이 pH 3.0 및 pH 2.0의 산성비 처리에서 대조구인 pH 5.6 처리에 비해 약 1.5배 정도 증가한 것으로 나타났다. Glutathione의 함량도 ascorbic acid와 유사한 경향을 보여 산성비 처리에 의해 GSSG/GSH의 비율이 증가하는 것으로 나타났다(Table 2). 이와 같은 DHA/AsA 및 GSSG/GSH 비율 증가는 산성비에 의해 활성산소가 생성되어 산화스트레스가 일어났음을 시사하며, 이를 무독화 하는 과정에서 산화형이 증가한 것으로 사료된다.

생물이 각종 환경스트레스를 받으면 생체내의 필수원소인 산소가 superoxide 등의 반응성이 높은 활성산소 종으로 변하여 DNA 합성억제, 호르몬과괴, 세포막분해, 단백질분해 등의 심각한 생리적 장애를 초래한다^{9,10)}. 그러나 생물은 오랜 진화과정을 통하여 체내에 생성된 활성산소를 효과적으로

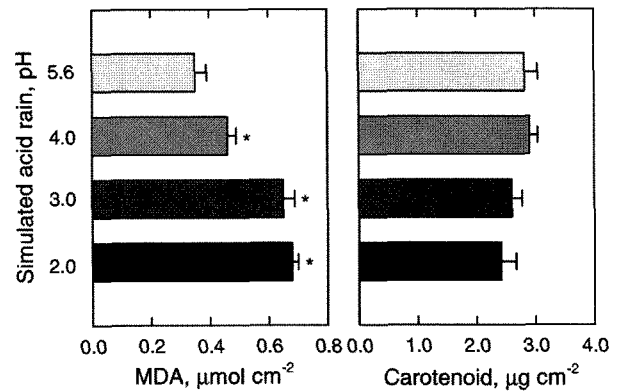


Fig. 2. Effects of simulated acid rain on contents of MDA and carotenoid of french marigold. Each value is mean±SE of 6 plants.

* represents significant difference at p < 0.05.

Table 1. Effects of simulated acid rain with different pH levels on the growth parameters of french marigold

Parameters	Control (pH 5.6)	Simulated acid rain, pH		
		4.0	3.0	2.0
Plant height, cm	17.8±0.8	16.8±0.9	14.3±0.7*	9.6±0.4*
Root length, cm	25.4±1.3	25.8±2.1	23.3±1.8	16.2±0.5*
Leaf area, cm ²	99.0±7.6	88.3±9.2	77.7±5.8*	17.0±1.3*
Leaf dry weight, g	0.40±0.03	0.37±0.02	0.34±0.02*	0.10±0.01*
Stem dry weight, g	0.16±0.01	0.14±0.01	0.13±0.01*	0.03±0.01*
Root dry weight, g	0.23±0.01	0.23±0.02	0.22±0.01	0.05±0.01*
Total dry weight, g	0.80±0.05	0.74±0.04	0.69±0.04*	0.18±0.03*

* represents significant difference at p < 0.05.

제거하는 방어기구를 가지고 있다⁹⁾. 본 실험에서 pH 3.0 및 pH 2.0의 산성비 처리에 의한 SOD의 활성은 대조구인 pH 5.6 처리에 비해 약 2.8배 전후의 큰 증가를 나타내었다(Fig. 3). 이는 산성비 처리에 의해 식물 체내에 superoxide가 생성되고 이를 무독화 시키기 위해 SOD의 활성이 증가한 것으로 사료된다. AP의 활성도 pH 3.0 및 pH 2.0의 산성비 처리에서 pH 5.6 처리에 비하여 약 1.6배 증가한 것으로 나타났으며, SOD에 의해 생성된 H₂O₂의 무독화를 위하여 AP의 활성이 증가된 것으로 사료된다. 또한 산성비의 H⁺ 부하량의 증가에 따라 DHAR, MDHAR, GR 및 GP의 활성도 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 GP의 경우 산성비의 pH가 낮아짐에 따라 활성이 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 항산화효소의 활성 증가는 대기오염물질이나 여러 가지 환경 스트레스에 의해서도 보고되어 있으며^{11,20,21,23)}, 산성비에 의해 만수국에 활성산소가 생성되고 이를 무독화하기 위해 식물의 생화학적 방어반응이 작용한 것으로 사료된다.

요 약

도시의 화단 및 꽃길 조성용으로 많이 이용되고 있는 만수국을 대상으로 산성비에 의한 식물 피해 양상을 조사하고, 산성비 처리가 활성산소 생성에 의한 산화 스트레스를 일으키는지를 조사함과 동시에 산성비에 대한 식물의 생화학적 방어반응을 조사하기 위하여 여러 농도의 인공 산성비(pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.6)를 제조하여 실험을 수행하였다. 산성비의 pH가 낮을수록 생육 피해는 심하게 나타났으며 pH 3.0 이하의 처리에 의해 암회색 또는 적갈색의 괴사 반점이 생성되었다. MDA 함량은 pH 2.0 처리에서 약 2배 정도의 증가를 나타내었다. 산성비의 H⁺ 부하량 증가에 따라 DHA/AsA 및 GSSG/GSH의 비율이 증가하였다. SOD, AP, GP 등의 항산화효소 활성도 산성비의 H⁺ 부하량의 증가에 따라 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 산성비는 만수국 식물에 활성산소 생성에 의한 산화스트레스가 일으키며,

Table 2. Effects of simulated acid rain on contents of ascorbate and glutathione in leaves of french marigold

pH levels	Ascorbic acid ($\mu\text{g cm}^{-2}$)			Glutathione ($\mu\text{g cm}^{-2}$)		
	AsA+DHA	AsA	DHA/AsA	GSH+GSSG	GSH	GSSG/GSH
5.6	9.6±0.5	4.6±0.5	1.1±0.1	8.3±0.5	4.2±0.3	1.0±0.2
4.0	10.4±0.6	4.8±0.3	1.2±0.1	8.2±0.4	3.9±0.4	1.1±0.2
3.0	12.5±1.1*	5.1±0.5	1.5±0.1*	11.0±1.2*	4.3±0.5	1.6±0.1*
2.0	12.7±0.9*	5.0±0.4	1.5±0.1*	10.5±0.7*	4.2±0.4	1.5±0.2*

Each value is mean±SE of 6 plants. * represents significant difference at $p < 0.05$. AsA, ascorbic acid; DHA, dehydroascorbic acid; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione.

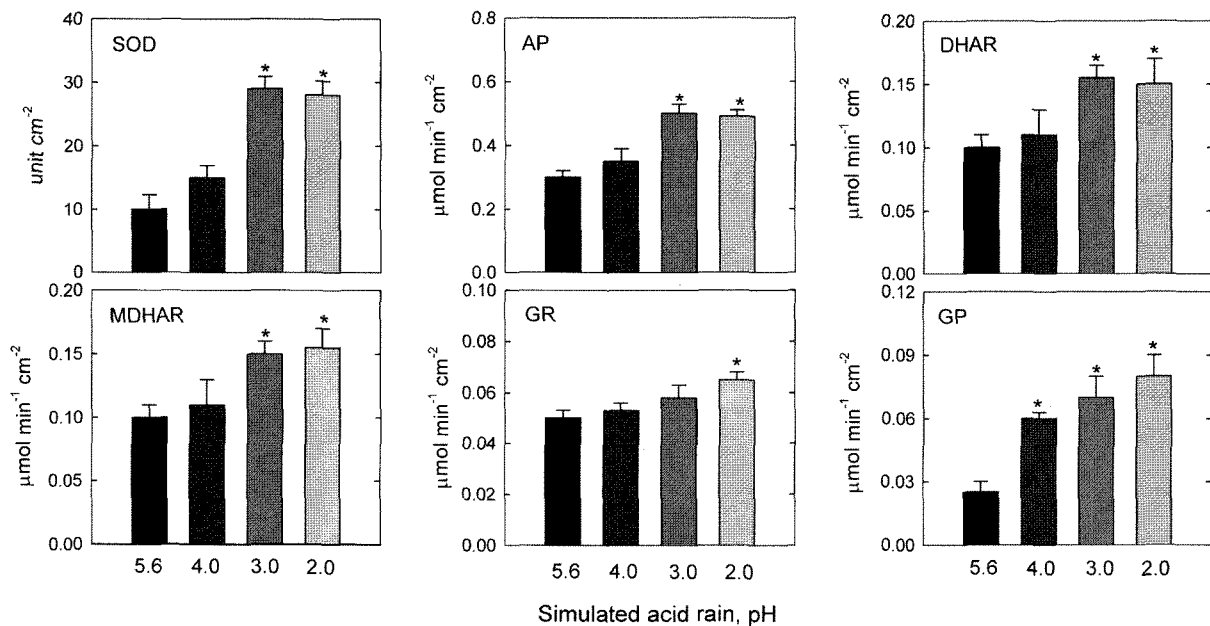


Fig. 3. Effects of simulated acid rain on activities of ascorbate peroxidase (AP), dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GP) in leaves of french marigold. Each value is the mean of 6 plants. Statistically significant differences between the means are indicated by "****" ($p < 0.05$).

이를 무독화하기 위해 식물의 생화학적 방어반응이 작용하는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Luxmoore, R. J., Gizzard, T. and Strand, R. H. (1981) Nutrient translocation in the outer canopy and understory of an eastern deciduous forest, *For. Sic.* 27, 505-518.
- Evans, L. S. and Curry, T. M. (1979) Differential response of plant foliage to simulated acid rain, *Amer. J. Bot.* 66, 953-962.
- Haines, B., Stefani, M. and Hendrix, F. (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.
- Nouchi, I. (1991) Acid rain and plant damage, *J. Agr. Met.* 47, 165-175.
- Craker, L. E. and Bernstein, D. (1984) Buffering of acid rain by leaf tissue of selected crop plants, *Environ. Pollut.* 36, 375-381.
- Binns, W. O. and Redfern, D. B. (1992) Acid rain and forest decline in West Germany, *Forestry Commission Res. Dev. Paper* 131, 13.
- Zedaker, S. M., Nicholas, N. Y. and Eagar, C. (1988) Assessment of forest decline in the Southern Appalachian surface fir forest, p.334-338. In Bucher, J. B. and Wallim, I. B. (eds.) *Air pollution and forest decline*, IUFRO, Switzerland.
- Pylypec, B. and Redmann, R. E. (1984) Acid-buffering capacity of foliage from boreal forest species, *Can. J. Bot.* 62, 2650-2653.
- Elstner, E. F. (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 73-96.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189-198.
- Kim, H. Y., Kobayashi, K., Nouchi, I. and Yoneyana, T. (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.
- Gabara, B., Sklodowska, M., Wyrwicka, A., Glinska, S. and Gapinska, M. (2003) Changes in the ultra-structure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves sprayed with acid rain, *Plant sci.* 164, 507-516.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants; Protective role of exogenous polyamine, *Plant sci.* 151, 59-66.
- Fan, H. B. and Wang, Y. H. (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.
- Huh, H. W. and Huh, M. K. (1998) The effect of simulated acid rain on the growth of important crops, *J. Kor. Environ. Sci.* 7, 123-131.
- Singh, A. and Agrawal, M. (1996) Response of two cultivars of *Triticum aestivum* L. to simulated acid rain, *Environ. Pollut.* 91, 161-167.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthesis, *Methods Enzymol.* 148, 305-352.
- Bolin, D. W. and Book, L. (1974) Oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic acid, *Science* 106, 451.
- Law, N. Y., Charles, S. A. and Halliwell, B. (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and paraquat, *Biochem. J.* 210, 899-903.
- Schoner, S. and Krause, G. H. (1990) Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold accumulation in excess light, *Planta* 180, 383-389.
- Tanaka, K., Kondo, N. and Sugahara, K. (1982) Accumulation of hydrogen peroxide in chloroplasts of SO₂ fumigated spinach leaves, *Plant Cell Physiol.* 23, 999-1007.
- Hossain, M. A., Nakano, Y. and Asada, K. (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide, *Plant Cell Physiol.* 25, 385-395.
- Tanaka, K. and Sugahara, K. (1980) Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ oxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation, *Plant Cell Physiol.* 21, 601-611.
- Lee, J. J., Neely, G. E., Perrjean, S. C. and Grothaus, L. C. (1981) Effects of simulated sulfuric acid rain on yield, growth and foliar injury of several crops, *Environ. Exp. Bot.* 21, 171-185.