

산성처리가 애기장대의 엽록소, 카로티노이드, 안토시아닌 등의 색소 함량에 미치는 영향

임 경 환*
인천대학교 생물학과

Effects of Acid Treatments on Chlorophyll, Carotenoid and Anthocyanin Contents in Arabidopsis

Kyung Hoan Im*

Department of Biology, University of Incheon, Incheon 406-840, Korea
(Received on January 5, 2010)

Arabidopsis seedlings subjected to low pH stress in the range of pH 5.6-4.0 did not show significant retardations in root and shoot growths. Treatment of pH 3.5-2.5 resulted in significant reductions in root and shoot length, especially in roots. Chlorophyll contents in seedlings increased during acid treatment of pH 5.6-4.0, but decreased by stronger acid treatment of pH 4.0 and lower pHs. Total carotenoid contents showed similar trend to chlorophyll contents by increasing during pH 5.6-3.5 treatments and decreasing by pH 3.0-2.5. Anthocyanin contents increased under acid stress of pH 5.6-3.0 and showed great reduction at pH 2.5. The ratios of carotenoids/chlorophylls and anthocyanins/chlorophylls increased by acid stress treatments. That indicates plants try to adjust physiologically to acid stress and protect chlorophylls by increasing carotenoid and anthocyanin contents. However, different responses of chlorophylls and anthocyanins to acid stress indicate both pigments play different roles in protecting plant from acid stress.

Keywords : Acid treatment, Anthocyanins, Arabidopsis, Carotenoids, Chlorophylls

산성비는 PH 5.6 이하인 비로 정의된다. 주로 공장이나 자동차 등에 사용하는 화석연료의 연소에 의해 생겨나며, 대기 중으로 방출된 질산화물이나 황산화물이 공기 중에 있는 수증기와 작용하여 강산성의 황산이나 질산을 형성하고 이것이 빗물에 씻겨 떨어지는 현상을 말한다.

산성비는 토양의 산성화를 초래하고 토양으로부터 영양분을 용출시켜 토양을 황폐화한다. 또한 토양으로부터 용출된 영양분이 호수나 강으로 들어가 야생생물을 죽여 생태계를 교란시키며 건물이나 동상 같은 구조물을 부식시키기도 한다. 산성비는 식물에 직접 작용하여 잎의 큐티클층을 파괴하여 그 결과 잎을 구성하는 세포의 세포막에서 각종 이온의 누출을 야기하며 결국 잎을 괴사시키는 것으로 보고되어 있다(Evans와 Curry, 1979). 또한

산성비는 식물에 직접적으로 작용하여 생장과 수확량을 감소시키고 산성비에 오래 노출된 수목에서 생장이 느려지거나 고사현상이 일어난다(Zedaker 등, 1988). 간접적으로 산성비는 알루미늄, 수은, 망간 같은 중금속들을 토양으로부터 분리시켜 그 중금속들이 식물체에 흡수되어 뿌리의 성장을 억제하고 식물의 생장을 방해한다(Foy, 1988; Delhaize와 Ryan, 1995).

산성비에 대한 식물의 반응에 대한 형태적, 분자생물학적 연구는 애기장대가 주로 사용되었다. 산성비를 처리한 애기장대 잎에서 표피세포와 엽육세포 등이 압착되어 있으며 이러한 압착으로 인해 나타나는 괴사 현상은 식물 병원균에 의해 감염되었을 때 나타나는 병반과 유사하다(박, 2005; Lee 등, 2006). 또한 산성비처리에 의해 발현이 증가하는 유전자군들이 식물병원균에 대한 식물의 저항성 신호전달기작 중 salicylic acid(SA)에 의존하는 경로에서도 발현이 증가하였다. 하지만 jasmonic acid(JA)에 의존하는 저항성 신호전달 기작에서 발현이 증가하는 유

*Corresponding author
Phone) +82-32-835-8298, Fax) +82-32-835-0763
Email) khim61@incheon.ac.kr

전자는 산성비처리에서는 발현에 큰 변화가 없는 것으로 보고되었다(Lee 등, 2006). 따라서 산성처리에 대한 식물의 반응은 식물병원균에 대한 저항성 신호전달 중 JA가 아닌 SA에 의존하는 기작의 일부를 사용 것으로 여겨진다(Lee 등, 2006). 산성비에 대한 식물의 반응에 대한 분자생물학적 연구로 현재까지 문헌 등을 조사한 바로는 Kim 등(2009)이 산성비 처리에 대한 유전자 반응을 애기장대에서 Affymetrix 유전자 칩을 사용하여 대량으로 조사한 것이 유일하다. 그 결과 병원균 또는 비생물학적 스트레스에 반응하여 발현이 증가하는 유전자들이 산성처리에서도 발현이 증가하였다. 발현이 감소된 유전자 그룹으로는 peroxidsae와 extensin 유전자들이었으며 이 그룹의 유전자 발현의 억제는 산성처리에서만 특이적인 것으로 보고되었다(Kim 등, 2009). 따라서 식물이 산성처리에 반응하는 신호전달경로는 일반적으로 식물이 병원균 또는 비생물학적 스트레스에 반응하는 신호전달경로를 공유하는 것으로 추정된다. 특히 식물이 상처를 입었을 때 보이는 반응이랑 산성비처리에 대한 식물의 반응이 다른 병원균이나 비생물학적 스트레스에 대한 반응보다 더 유사한 신호전달 경로를 사용하는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2009).

본 연구에서는 실험 모델식물인 애기장대를 사용하여 산성도가 다른 산성비가 식물의 성장과 광합성에 관계된 색소함량에 어떤 영향을 끼치는지 조사하였다. 다양한 생물학적 및 비생물학적 스트레스가 엽록소, 카로티노이드 및 안토시아닌 색소함량에 끼치는 효과에 대한 연구가 있으나 산성처리에 대한 색소 함량의 변화에 대한 연구가 지금까지의 문헌조사 결과 보고되지 않았다. 엽록소는 광합성에 가장 중요한 색소이며 카로티노이드는 푸른빛을 흡수하여 광합성을 하며 동시에 광합성과정에서 생긴 triplet-state 엽록소와 singlet oxygen을 없애 줌으로써 광합성조직을 보호한다. 카로티노이드가 없으면 엽록소는 광산화하여 제 기능을 못하게 되며 결국 식물은 죽게 된다. 안토시아닌은 수용성 플라보노이드로 식물에서 분홍색 또는 자주색으로 나타난다. 안토시아닌은 광합성조직 세포의 액포에 많이 존재하며 식물세포를 UV와 blue-green light의 피해로부터 보호한다. 안토시아닌은 식물이 다양한 스트레스에 노출되었을 때 축적되며 황산화제로 작용하며 스트레스 처리시 생성된 free-radicals을 제거하는 것으로 여겨진다(Hatier와 Gould, 2008). 따라서 본 연구에서는 산성비에 준하는 산성처리에 대해 엽록체를 비롯한 색소들의 조성이 어떻게 변화되는지에 연구의 중점을 두었다. 비병원성 스트레스의 하나인 산성비에 대한 식물 색소의 반응에 대한 연구가 미약한 현실에서 식물

이 산성비에 대한 저항성 또는 적응 메커니즘을 연구하는데 중요한 자료를 제공할 것으로 기대한다.

재료 및 방법

식물재료 및 산성 처리. 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), ecotype Colombia-0(Col0) 종자를 1% 과산화수소로 5분간 소독한 다음 70% 에탄올로 5분간 소독하였다. 그 다음 멸균수로 세척한 다음 4°C에서 이틀간 저온처리를 하였다. 처리된 종자는 2% Sucrose를 함유하는 MS 배지에 (Murashige와 Skoog, 1962) 과중한 후 23°C, 50~70% 상대습도, 장일(16시간 광/8시간 암)에서 유지하였다. 줄기 및 뿌리 길이 측정과 색소함량 측정을 위해서 과중 후 8일 된 식물을 수확하여 사용하였다. 산성 처리는 멸균된 petri dish안에 3MM blotting paper를 깔고 pH를 각각 5.6, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5로 조절된 MS 액체배지를 부어서 blotting paper를 완전히 적신 후 종자를 과중하였으며 길이 및 색소 측정을 위해 식물을 수확할 때까지 blotting paper를 젖은 상태로 유지하였다. MS 배지의 pH는 0.1 N H₂SO₄로 조절하였다.

색소함량 분석. 클로로필 및 카로티노이드 함량분석은 각각 다른 pH로 처리한 식물의 잎을 수확하여 15 ml의 메탄올에서 균질화시킨 후 균질화 된 현탁액을 거름종이로 걸러 여과액을 3,000 g에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 분리된 상층액은 분광흡도계를 사용하여 470, 653, 666 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 전체 클로로필 및 카로티노이드 함량은 Wellburn(1994)의 방법에 따라 측정하였으며 그 공식은 다음과 같다.

$$\text{전체 클로로필: } 15.65A_{666} - 7.34A_{653} + 27.05 A_{653} - 11.21 A_{666}.$$

$$\text{전체 카로티노이드: } 1000A_{470} - 2.86(15.65A_{666} - 7.34A_{653}) - 129.2(27.05A_{653} - 11.21 A_{666})/245.$$

모든 색소함량은 잎의 생중량으로 나누어 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (fresh weight)로 기록하였다. 안토시아닌 함량측정은 식물의 잎을 채취하여 상기의 방법으로 메탄올로 균질화시킨 식물 잎 여과액을 530과 653 nm의 빛의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 안토시아닌 함량측정은 Murray와 Hackett(1991)의 공식(전체 안토시아닌: $A_{530} - 0.24A_{653}$)을 사용하였다.

결과 및 고찰

수소이온 농도가 뿌리 및 줄기 성장에 미치는 영향

산성비가 식물의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 애기장대 새싹을 각기 다른 pH의 배지에서 8일간 키

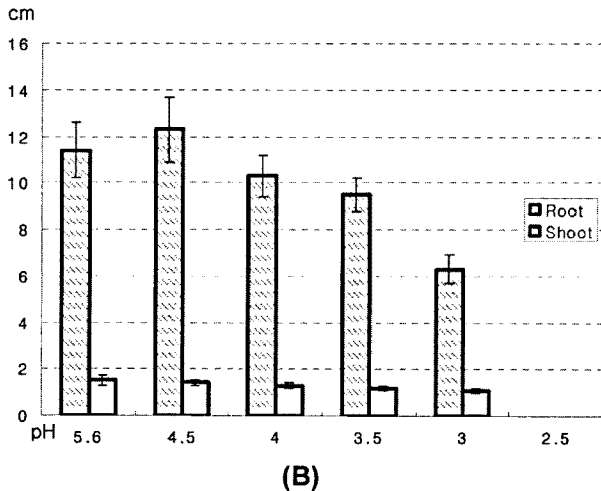
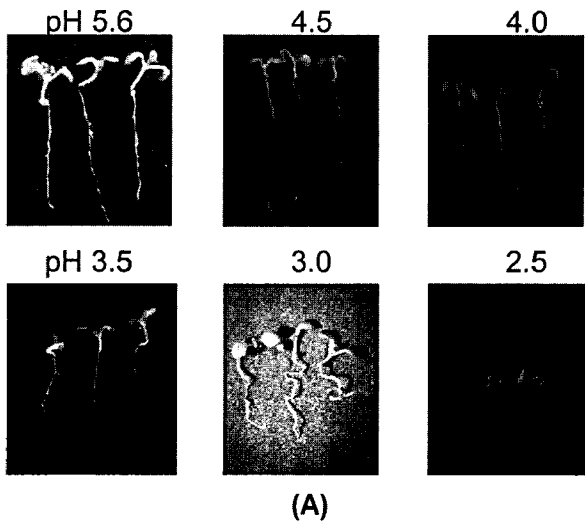


Fig. 1. Effects of pH on seedling growth. (A) Arabidopsis seedlings grown on MS medium of various pH. Photographs were taken 8 days after sowing. (B) Average lengths of roots and shoots of 8-day-old seedlings grown on different pH. Twenty samples were counted for each treatment.

위 그 성장 정도를 알아 보았다(Fig. 1). pH 5.6-4.0 처리는 식물의 발아 및 성장에 현저한 장애는 초래하지 않았다. pH 3.5 처리부터 수소이온농도가 높아질수록 식물이 뿌리 및 줄기의 생장이 위축되었으며 특히 뿌리가 줄기보다 더 민감하게 반응하였다. 강산성인 pH 2.5인 배지에 파종한 식물은 발아하였으나 뿌리 및 줄기 본엽 등을 형성하지 못하였다. 뿌리길이는 pH 5.6에서 11.4 cm였으나 pH 4.5에서 12.3 cm로 가장 길었으며 대조식물(pH 5.6)보다 오히려 8% 더 길었다. pH 4.5를 정점으로 pH가 내려갈수록 뿌리길이가 짧아졌으며 pH 3.5에서는 대조식물의 83%, pH 3.0에서는 56% 수준으로 줄어들었으며 pH 2.5의 높은 수소이온농도에서는 뿌리가 전혀 발생하지 않

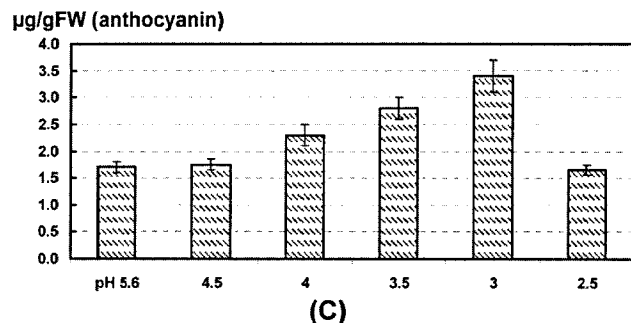
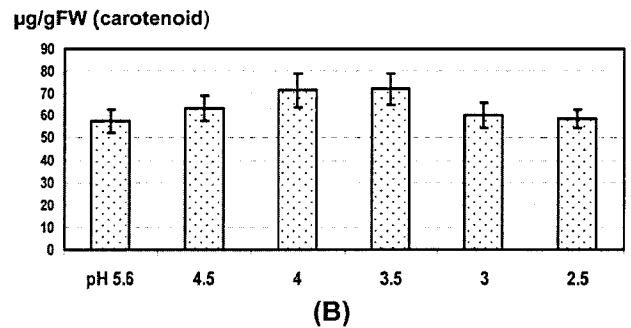
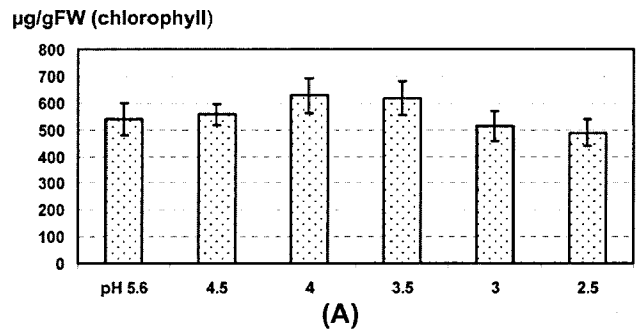


Fig. 2. Effects of various pH on chlorophyll (A), carotenoid (B), and anthocyanin contents (C) of Arabidopsis.

았다. pH가 5.6-3.0까지 변하는 동안 줄기는 완만하게 줄어들어 pH 3.0에서 대조식물의 70%의 길이를 보였다. pH 2.5에서는 줄기가 생성되지 않았다. 애기장대에서 산성조건에서 줄기 및 뿌리의 신장이 pH 5.6에서 보다 pH 4.5에서 더 활발하였다. 따라서 애기장대는 약산성 조건에서 더 잘 자라는 산성식물이며 pH 3.5나 그 이하의 강한 산성 조건에서 생육이 억제되었다.

수소이온 농도에 따른 색소함량의 변화. 산성처리를 한 식물에서 엽록소 함량은 pH 5.6-4.0까지 pH가 낮아질수록 증가하였다. pH 4.0에서 내려갈수록 점진적으로 엽록소 함량이 감소되는 경향을 보였다(Fig. 2A). 카로티노이드도 엽록소와 같은 경향을 보였으나 pH 3.5에서 함량이 가장 높았다(Fig. 2B). 안토시아닌은 pH 5.6-3.0까지 pH가 낮아질수록 계속 증가하여 pH 3.0에서 가장 많이

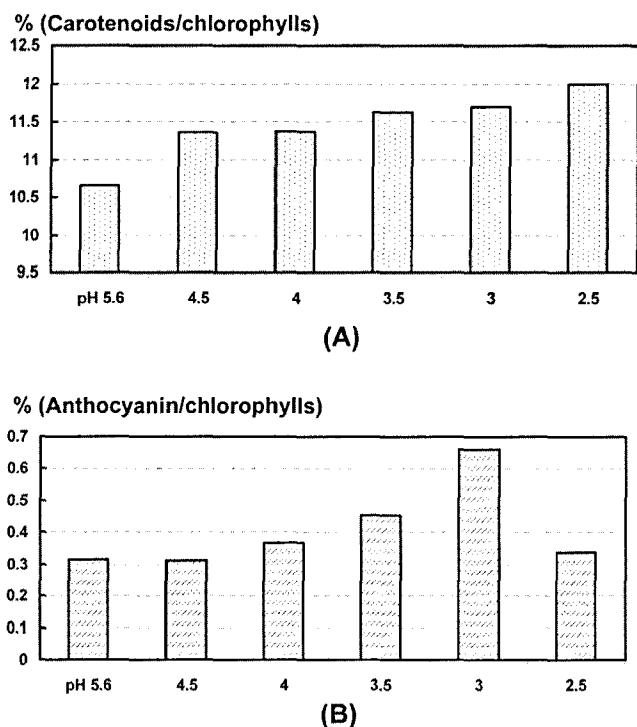


Fig. 3. Effects of pH on the ratio of carotenoid (A) and anthocyanin (B) to chlorophyll.

축적되었으며 pH 2.5에서는 급격히 감소되었다(Fig. 2C). 애기장대는 산성식물로 수소이온 농도가 pH 3.5까지 낮아지는 과정에서 생육이 크게 해를 받지 않았다. 이런 현상은 광합성에 필요한 엽록소와 카로티노이드 색소량에서도 확인되었다. 엽록소는 pH 4.0까지 증가하였으며 카로티노이드는 엽록소량 같은 경향을 보였으나 다른 점은 pH 3.5까지 함량이 증가하였다. 카로티노이드 함량이 엽록소 함량에 비례하여 증가하며 스트레스 강도가 세어질수록 엽록소대비 식물체내 카로티노이드 함량이 증가한다는 것은 엽록소를 보호하기 위한 식물의 생리적 반응으로(Fig. 3A) 특히 pH 2.5에서는 총 엽록소와 카로티노이드 함량이 줄어들었지만 엽록소 대비 카로티노이드 함량이 가장 높아 심한 스트레스 조건에서 엽록소를 보호하려는 경향을 나타냈다(Fig. 3A). 카로티노이드는 스트레스로 인한 photodamage로부터 엽록소를 보호하는 것으로 이미 잘 알려져 있다(Armstrong과 Hearst, 1996). 반면 안토시아닌은 pH 5.6-3.0까지 높은 수소이온농도의 스트레스가 심해질수록 함량이 증가하였다. 그러나 pH 2.5의 강산성 조건에서는 식물체내 함유량이 급격히 낮아져 식물체가 안토시아닌 함성에 심한 타격을 입었거나 안토시아닌의 안전성이 낮아진 것으로 판단된다. 그러나 pH 4.5-3.0의 스트레스 조건에서는 클로로필, 카로티노이드보

다 더 빠른 속도로 식물 내에 축적되었다(Fig. 2C, Fig. 3). 안토시아닌도 카로티노이드와 마찬가지로 고수소이온 스트레스가 심해질수록 엽록소대비 식물체내 함량이 증가하였으며 특히 고수소이온 스트레스가 분명하게 나타나기 시작하는 pH 3.5-3.0에서 현저하게 함량이 증가하였다(Fig. 3B). 본 실험의 결과 안토시아닌이 높은 수소이온 농도의 스트레스에서 카로티노이드와는 식물을 보호하는 기작이 다를 것으로 예상된다. 안토시아닌은 다른 비생물학적 스트레스 처리에서도 축적되는 것으로 보고되어 있으며 아직 스트레스에 관련하여 정확하게 어떤 기능을 하는지는 알려져 있지 않으나 안토시아닌은 상당한 량의 햇빛을 흡수 할 수 있기 때문에 스트레스 조건에서 엽록소로 가는 quantum load를 줄여서 활성산소 발생을 억제하여 엽록소를 보호하거나 생성된 활성산소를 제거하거나 antioxidant enzymes을 보호할 것으로 추정된다(Hatier와 Gould, 2008). 따라서 다른 스트레스와 마찬가지로 높은 수소이온 스트레스 상황에서 안토시아닌이 축적되는 것으로 이 실험에서 밝혀졌지만 축적된 안토시아닌이 단지 스트레스의 결과물인지 아니면 스트레스를 덜어주기 위한 어떤 역할을 하는지는 명확하지 않다. 안토시아닌이 강한 빛, 자외선, 고온 또는 저온, 중금속, 가뭄 등 다양한 비생물학적 스트레스 상황에서 축적되며 활성산소의 발생 억제 또는 제거를 원활하게 해 줌으로서 식물을 보호 할 것으로 여겨지지만(Hatier와 Gould, 2008) 정확한 기작은 아직 알려져 있지 않다.

이번 실험결과에서도 수소이온농도에 대한 식물체내 함유량이 카로티노이드와는 다르게 작용하여 두 개의 분자가 식물체내 활성산소의 농도를 낮추어주는 것에 기여를 하는 것은 맞지만 그 기작이 다를 것으로 여겨진다.

요 약

산성비 수준의 고농도 수소이온 스트레스인 pH 5.6-4.0 처리는 애기장대 생장에 크게 해를 주지 않았으며 강산성인 pH 3.5 이하에서 수소이온 농도가 높아질수록 식물이 뿌리 및 줄기의 생장이 위축되었으며 특히 뿌리가 줄기보다 더 민감하게 반응하였다. 엽록소 함량은 pH 5.6-4.0까지 pH가 낮아질수록 증가하였다. pH 4.0에서 내려갈수록 점진적으로 엽록소 함량이 감소되는 경향을 보였으며 카로티노이드도 엽록소와 같은 경향을 보였으나 pH 3.5에서 함량이 가장 높았다. 안토시아닌은 pH가 낮아질수록 계속 증가하여 pH 3.0에서 가장 많이 축적되었으며 pH 2.5에서는 급격히 감소되었다. 스트레스 강도가 세어질수록 엽록소 대비 식물체내 카로티노이드 및 안토시아

닌 함량이 증가한다는 것은 엽록소를 보호하기 위한 식물의 생리적 반응으로 여겨진다. 그러나 안토시아닌과 카로티노이드는 수소이온 농도에 따른 식물체내 함량의 변화가 상이하여서 고수소이온 스트레스에서 식물을 보호하는 기작이 다를 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 인천대학교 교내 연구비(2007-0329) 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Armstrong, G. A. and Hearst, J. E. 1996. Carotenoidss 2: Genetics and molecular biology of carotenoids pigment biosynthesis. *Faseb J.* 10: 228-237.
- Delhaize, E. and Ryan, P. R. 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107: 315-321.
- Evans, L. S. and Curry, T. M. 1979. Differential responses of plant foliage to simulated acid rain. *Am. J. Bot.* 66: 953-962.
- Foy, C. D. 1988. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19: 959-987.
- Hatier, J. H. B. and Gould, K. S. 2008. Foliar anthocyanins as modulators of stress signals. *J. Theor. Biol.* 253: 625-627.
- Kim, J. K., Baek, S. A., Yoon, S., Park, H. J., Lee, S. C., Lee, T. S. and Im, K. H. 2009. Global Analysis of Gene Expression upon Acid Treatment in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Pathology J.* 25: 172-178.
- Lee, Y., Park, J., Im, K. H., Kim, K., Lee, J., Lee, K., Park, J. A., Lee, T. K., Park, D. S., Yang, J. S., Kim, D. and Lee, S. 2006. *Arabidopsis* leaf necrosis caused by simulated acid rain is related to the salicylic acid signaling pathway. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 38-42.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murray, J. R. and Hackett, W. P. 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanins accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant Physiology* 97: 343-351.
- 박종범. 2005. 애기장대의 shoot 성장과 내부조직에 미치는 인공산성비의 영향. *J. Life Sci.* 15: 889-894.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoidss, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.
- Zedaker, S. M., Nicholas, N. S. and Eagar, C. 1988. Air pollution and forest decline. IUFRO Press.