

오존이 보리(*Hordeum vulgare* L.) 葉綠體의 光合成 活性에 미치는 影響

朴康殷·鄭華淑^{*}·宋承達¹·盧光洙²·宋鍾碩³

慶北大學校 師範大學 生物教育科, ¹慶北大學校 自然科學大學 生物學科

²啓明大學校 自然科學大學 生物學科, ³安東大學校 自然科學大學 生物學科

보리(*Hordeum vulgare* L.) 유식물의 녹화시기에 따라 오존이 엽록체의 광합성 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 황백화된 보리 유식물을 녹화하는 중에 오존(0.5 ppm과 1.0 ppm)을 4시간 동안 처리하여 엽록소 함량, 광계 I과 II 활성 및 엽록소 형광을 측정하였다. 녹화를 시작하므로 엽록체가 발달되는 초기에 오존이 미치는 영향은 24시간 녹화구에서 엽록소 함량을 많이 감소시켰으나 48시간 녹화한 경우에는 대조구와 유사하였다. 24시간 녹화구에서는 처리한 오존의 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 Fo, Fv, Fm 및 qE가 급격히 감소하였으나 Fv/Fo와 qP는 감소하지 않았으며, 48시간 녹화구에서는 Fo, Fv, Fm 및 qE가 많이 회복되었다. 엽록체의 발달 중기에 오존이 미치는 영향은 오존의 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 광계 II 활성을 감소시켰으며 광계 I 활성은 감소시키지 않았고, Fv와 Fv/Fm 비가 크게 감소하였으며, 형광 소멸 분석에서는 qP와 qR이 특히 많이 감소하였다.

주요어: 오존, 보리 유식물, 녹화, 엽록소 형광, 광계 II 산화부위

오존은 광화학적 주요 산화제이며 가장 위험하고 가장 널리 산재하는 대기 오염물질로 식물체에 미치는 독성이 강하다 (Reich *et al.*, 1984; Rosemann *et al.*, 1991). 오존은 확산에 의해 식물 잎의 기공을 통해 들어가서 세포벽과 세포막을 분해하고 (Laisk *et al.*, 1989), 또한 다양한 독성물질을 만들며 이것은 세포내로 이동한다(Heath, 1994). 저농도의 오존에 의해서는 가시적인 손상이 나타나지 않아도 광합성과 CO₂ 고정이 억제되어 식물체의 생산성이 감소된다(Saurer *et al.*, 1991). *Chlorella*에 고농도의 오존을 처리하였을 때 산소발생이 수 십분 이내에 완전히 억제되었으며(Heath, 1994), 분리한 엽록체에 오존을 처리하면 그라나의 내부 층에 많이 분포하는 광계 II 복합체보다는 바깥 부분에 있는 광계 I 복합체에 영향을 주어 광계 II 활성보다 광계 I 활성이 많이 억제되었다(Coulson and Heath, 1974). 한편 콩잎에 오존을 처리하여 엽록소 형광(Kautsky effect)을 측정할 결과 암상태에서 오존을 처리하는 것보다 광에서 처리한 경우에 영향이 크며 오존에 의한 1차 손상 부위는 두 광계 사이의 전자전달 억제보다는 광합성 물분해 효소계인 것으로 제시되었다(Schreiber, 1978).

오존이 식물체에 미치는 영향에 관한 연구가 많이 진행되어

왔으나, 오존이 엽록체에 미치는 영향과 광합성 기구에 작용하는 부위 및 작용방식에 대해서는 논란이 많았었다. 오존은 일반적으로 광합성 기구에 영향을 줌으로써 식물체에 심각한 손상을 야기시킨다(Heath, 1994). 그런데 식물체가 저농도의 오존에 장기간 노출되면 오존에 대해 방어적인 반응을 보여 저항성이 생겨서 직접적인 억제 부위를 밝히기에는 불리하게 된다(Eckey-Kaltenbach *et al.*, 1994). 그러므로 오존이 식물체의 광합성 기구에 미치는 1차적인 억제 부위를 밝히기 위해서는, 식물체가 오존에 대해 민감하게 영향을 받으며 광화학 활성이 신속하게 증가되는 어린 시기에 비교적 고농도의 오존을 단 시간 처리하는 것이 유리하다고 생각된다. 한편 녹화된 식물체에 미치는 오존의 영향, 작용부위 및 작용방식 등은 황백화된 식물체가 녹화되면서 엽록체가 발달할 때 오존이 미치는 영향과 차이가 날 것으로 생각된다. 최근의 형광분석법은 광화학적 변화, 광효율성 및 틸라코이드막의 구조와 에너지의 전환 과정도 해석을 가능하게 한다(Falk *et al.*, 1992). 그러므로 황백화된 식물이 광에 의해 엽록체의 발달이 유도될 때 오존이 미치는 영향을 밝히기 위해 엽록소 형광 측정 방법을 이용하여 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 황백화된 보리 유식물을 이용하여 단시간 동안 약광하에서 엽록체 발달 단계에 따라 오존을 처리하고 난 후에 나타나는 증상을 알아보고자 엽록체 발달 과정 중

*교신저자: Fax (053) 950-6809
© 한국식물학회 [서울] 1995

exponential phase와 steady-state phase일 때의 광계 II와 광계 I의 활성, 엽록소 a 형광, 엽록소 함량을 비교 분석하여 오존이 보리 유식물의 엽록체 발달 단계에 따라 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

식물 재료

성주군 농촌지도소에서 분양받은 보리(*Hordeum vulgare* L. cv. Olbori) 종자를 증류수에 세척한 후 파종하여 온도는 22 ± 2 °C, 상대습도는 $70 \pm 5\%$ 로 하여 암소에서 5일간 키운 황백화된 보리 유식물을 실험재료로 이용하였다. 엽록체 추출과 엽록소 함량 그리고 엽록소 형광 측정을 위해서 보리의 제 일엽을 끝에서 1 cm 제거하고 난 후 끝부분을 2 cm 길이로 잘라서 사용하였다.

오존 처리

엽록체 발달 단계에 따라 오존이 미치는 영향을 알아보기 위해서 0.5와 1.0 ppm의 오존을 황백화된 보리 유식물에 4시간 동안 각각 처리하면서 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광을 조사하여 24 시간과 48시간 녹화하였으며(Fig. 1A, C), 20시간과 44시간 녹화시킨 후 오존을 4시간 처리하면서 계속 녹화시켰으며(Fig. 1B, E), 또한 오존 처리 후 24시간 뒤의 변화를 보기 위해서 오존 처리 후 24시간 녹화시켰다(Fig. 1D, F).

오존 발생은 고압 방전에 의한 오존 발생장치로 하였으며 오존 농도는 UV photometric O_3 analyzer (Model: Dasibi 1108)로 측정하여 ± 0.05 ppm으로 조절하였다. 오존 처리 및 녹화는 $49 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 41 \text{ cm}$ 크기의 생장실에서 하였으며 온도는 22 ± 2 °C, 상대습도는 $70 \pm 5\%$ 로 하였다.

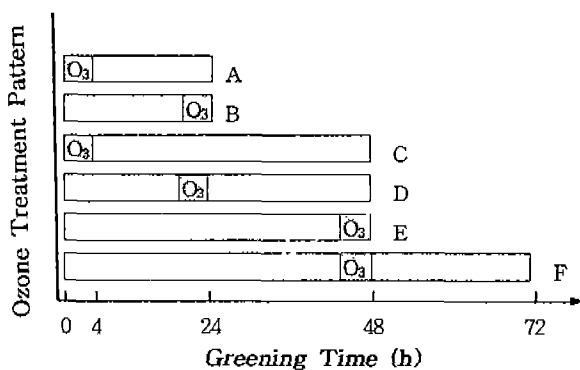


Fig. 1. Ozone treatment pattern and greening time.

엽록체 추출

Obokata(1987)의 방법을 변형하여 냉각한 증류수로 세척한 보리잎 1 g과 STN buffer (pH 8.0, 0.4 M sucrose, 0.05 M Tris, 0.01 M NaCl) 10 mL를 냉각시킨 막자사발에 넣어서 마쇄하여 2점의 거즈로 여과하였다. 이 여과액을 300 g에서 1분간 원심분리하여 침전물은 버리고 상정액을 다시 600 g에서 10분간 원심분리한 후 침전물에 STN buffer (pH 7.8) 10 mL를 분주하여 현탁한 후 1,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 모든 추출과정은 0-4°C에서 행하였다.

엽록소 함량 측정

엽록소의 추출은 Hiscox와 Israelstam(1979)의 방법에 따라 DMSO (dimethyl sulfoxide) 10 mL에 잎 0.1 g을 넣고 65°C의 항온 수조에 3시간 동안 두었다. 엽록소 a와 b의 함량은 Arnon (1949)의 방법에 따라 663 nm, 645 nm에서 흡광도를 측정하였고 carotenoid 함량은 Jensen과 Jensen(1971)의 방법에 따라 480 nm에서 흡광도를 측정하여 각 색소의 함량을 정량하였다.

전자전달 활성

측정광합성의 광계 I과 광계 II의 전자전달 활성은 Clark형의 산소전극을 이용하여 20°C에서 각각 산소 소모량과 발생량을 측정하였다. 광계 I의 전자전달 활성은 50 mM Hepes buffer (pH 7.8, 100 mM sucrose, 2 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl)와 2 mM methyl viologen, 2 mM NaN_3 , 1 μM DCMU[3-(3,4-dichloro-phenyl)-1,1-dimethyl-urea], 0.1 mM DCPIP (2,6-dichlorophenol indophenol), 5 mM ascorbate, 2 mM NH_4Cl , 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 엽록소가 포함된 반응액으로 산소 소모량을 측정하였다(Atal *et al.*, 1991). 광계 II의 전자전달 활성은 50 mM Hepes buffer (pH 7.8)와 0.5 mM *p*-phenylenediamine, 2 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0.05% BSA, 2 mM NH_4Cl , 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 엽록소가 포함된 반응액으로 산소의 발생량을 측정하였으며(Critchley, 1981). 또한 DCPIP 광환원율에 의한 광계 II의 활성측정은 50 mM Hepes buffer (pH 7.8)와 30 μM DCPIP, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 엽록소가 포함된 반응액으로 20°C에서 측정하였다(Terashima *et al.*, 1989). 광계 II 전자 공여체인 DPC (1,5-diphenylcarbazide)는 Vernon과 Show(1969)가 사용한 방법을 따랐으며 반응액의 최종 농도는 0.15 mM이 되도록 하였다. 이때 엽록소 함량은 Arnon(1949)의 방법에 따라 80% acetone으로 652 nm에서 전체 엽록소의 함량을 측정하였다.

엽록소 형광 측정

엽록소 a 형광 측정은 PAM (Walz Co.)을 이용하였으며, intact 잎을 20분간 암적응시킨 뒤 0.3×0.9 cm 크기의 sample holder를 통해 측정광(1.6 kHz로 변조된 약한 적색광: 0.1 μmol·m⁻²·s⁻¹)을 조사하여 Fo(광계 II의 반응중심이 모두 열려있을 때의 형광)를 구하고, 포화광(3,000 μmol·m⁻²·s⁻¹)을 조사한 뒤 Fm(광계 II의 반응중심이 모두 닫혀 전자 수용체 quinone이 완전히 환원 상태에 있을 때의 형광)을 측정해서 광계 II 활성의 지표로 이용하였다. Fm-Fo에 의해 Fv를 구하여 Fv/Fo 비율을 구하고 비교 분석하였다(Driesenaar *et al.*, 1994).

형광 소멸 계수를 구하기 위해서는 지속적인 actinic light (1,330 μmol·m⁻²·s⁻¹)를 조사하면서 제작된 timer를 이용하여 포화광을 20초 주기로 1초간 pulse 처리하였다. 형광 소멸 계수는 Oxborough와 Horton(1988)의 방법에 따라 qP (photochemical quenching), qNP (nonphotochemical quenching), qR (fluorescence quenching that is not reversed by DCMU) 그리고 qE (energy-dependent fluorescence quenching)를 구하였다.

결과 및 고찰

엽록소 함량

Table 1은 황백화된 보리 유식물을 녹화시킬 때 처음 또는 마지막 4시간 동안 오존을 처리한 후 측정한 엽록소 함량

변화를 나타낸 것이다. 녹화시 처음 4시간 동안 오존을 처리한 후 녹화시킨 경우에는 처리한 오존의 농도가 0.5에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 엽록소 a, b 그리고 carotenoid 함량은 감소되었으며, 1.0 ppm의 오존을 처리하여 24시간 녹화한 경우 (Fig. 1A)에는 엽록소 a, b 및 carotenoid 함량이 대조구보다 각각 약 44, 27 그리고 18% 적었으나, 48시간 녹화시킨 경우에는 (Fig. 1C) 대조구보다 각각 약 27, 21 그리고 16% 적었다. 엽록소 a/b 비는 24, 48시간 녹화했을 때 처리된 오존 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 감소하였으며, 1.0 ppm의 오존 처리했을 때 24시간 녹화한 경우 약 9% 감소하였으며 48시간 녹화한 경우에는 약 7%만 감소하였다.

황백화된 보리 유식물을 녹화시킬 때 마지막 4시간 동안 0.5 ppm과 1.0 ppm의 오존을 처리한 후 측정한 엽록소 a, b 그리고 carotenoid 함량은 24시간 녹화한 경우 (Fig. 1B) 처리한 오존의 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 감소하였으나 48시간 녹화했을 때는 (Fig. 1E) 대조구와 유사하게 나타났다. 1.0 ppm 오존을 처리한 경우 24시간 녹화했을 때 엽록소 a, b 그리고 carotenoid 함량은 대조구보다 각각 약 13, 7 및 7% 적게 나타났다. 그리고 48시간 녹화한 경우에는 엽록소 함량이 감소하지 않았는데 이것은 오존에 의해 엽록소가 파괴되지 않았다는 것을 나타내며, 24시간 녹화했을 때의 엽록소가 대조구보다 적게 나타난 것은 오존이 엽록소를 분해했다기 보다는 4시간 동안 엽록소의 합성이 억제되었기 때문으로 생각된다. 그리고 엽록소 a/b 비도 24시간 녹화했을 때에는 처리한 오존의 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증

Table 1. Effects of the various concentrations of ozone on the levels of chlorophyll contents. Ozone was treated to the barley seedling for the first or the last 4 h during greening periods

Ozone treatment and Greening time ^a	Treatment of Ozone	Chlorophyll contents (μg/g fr wt)			
		Chl a	Chl b	Carotenoid	Chl a/b
A	Control	439(100%)	148(100%)	135(100%)	2.966(100%)
	0.5 ppm	364(83%)	128(87%)	126(93%)	2.844(96%)
	1.0 ppm	290(66%)	108(73%)	110(82%)	2.685(91%)
B	0.5 ppm	410(93%)	141(95%)	129(96%)	2.908(98%)
	1.0 ppm	386(88%)	138(93%)	126(93%)	2.797(94%)
C	Control	533(100%)	161(100%)	141(100%)	3.311(100%)
	0.5 ppm	450(86%)	145(90%)	129(92%)	3.159(95%)
	1.0 ppm	388(73%)	127(79%)	118(84%)	3.055(92%)
D	0.5 ppm	415(78%)	129(80%)	134(95%)	3.327(101%)
	1.0 ppm	350(66%)	112(70%)	125(89%)	3.125(94%)
E	0.5 ppm	531(100%)	160(99%)	140(99%)	3.319(100%)
	1.0 ppm	527(99%)	160(99%)	138(98%)	3.294(100%)
	Control	552(100%)	165(100%)	152(100%)	3.346(100%)
F	0.5 ppm	505(92%)	152(92%)	146(96%)	3.322(99%)
	1.0 ppm	470(85%)	139(84%)	140(92%)	3.381(101%)

^aOzone treatment and greening time were explained in materials and methods (Fig. 1).

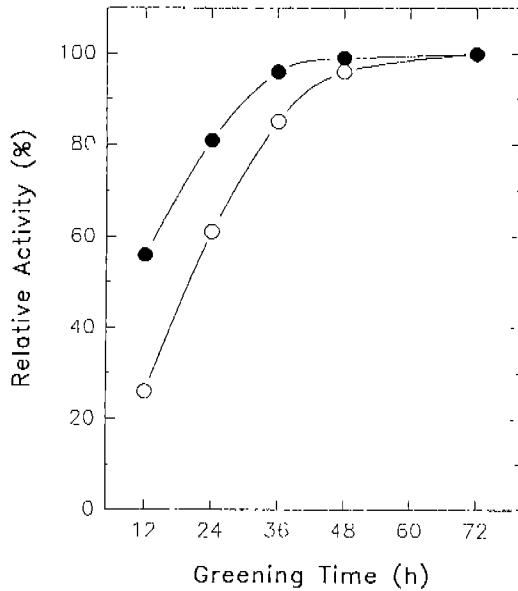


Fig. 2. Changes of PS I and II activities of barley chloroplasts during greening periods. The greening of etiolated barley seedling was initiated by the illumination of $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. The values corresponding to 100% of PS I and II activities were 270 and $125 \mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. ●, PS I; ○, PS II.

가함에 따라 대조구보다 적었으나 48시간 녹화했을 때는 대조구와 유사하게 나타났다.

녹화도중 오존을 처리한 후 24시간 뒤의 변화를 알아보기 위하여 황백화된 보리 유식물을 24시간과 48시간 녹화할 때 마지막 4시간 동안 오존을 처리한 후 24시간 뒤에 측정한다(Fig. 1D) 엽록소 a, b 및 carotenoid 함량은 오존 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 감소하였으며 48시간 녹화구(Fig. 1F)보다 24시간 녹화구에서(Fig. 1D) 크게 감소하였다. 24시간과 48시간 녹화구에서 1.0 ppm의 오존 처리 후 즉시 측정된 총 엽록소 함량은 각각의 대조구에 비해 약 89%와 99%였으나 오존 처리한 후 24시간 뒤에 측정된 총 엽록소 함량은 각각 약 66%와 83%로 나타났다. 그리고 엽록소 a/b의 비는 24시간과 48시간 녹화구에서 오존 처리 농도와 상관없이 대조구와 유사하게 나타났다. Sakaki 등(1994)은 0.5 ppm의 오존을 6시간 동안 처리한 후 측정했을 때 총 엽록소 함량은 거의 변화가 없었지만 20시간 후에 측정된 결과 대조구에 비해 감소했다고 보고한 바 있다.

전자 전달 활성

황백화된 보리 유식물에 비교적 약광($60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)을 조사하여 녹화시간에 따라 광계 I과 II 활성을 측정된 결과

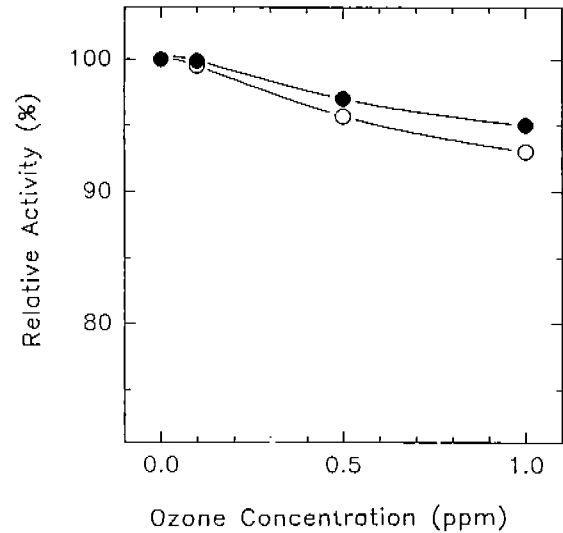


Fig. 3. Effects of the various concentrations of ozone on the levels of oxygen uptake (PS I activity) by isolated chloroplasts. Ozone was treated to barley seedling for the last 4 h during greening periods. The greening periods were 24 h (○) and 48 h (●). The values corresponding to 100% of 24 and 48 h greening were 219 and $267 \mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively.

광계 I이 광계 II보다 빨리 발달되었으며 약 48시간 녹화시키므로 광계의 발달이 완성되었다(Fig. 2). 그러므로 광계 II 활성이 약 60%로서 광계 II의 발달이 완성하게 일어나는 24시간과, 광계 II 활성이 약 96%로서 광계 II 발달이 완료될 때인 48시간을 기준으로 하여 오존 처리시 녹화시간을 정하였다.

Fig. 3은 황백화된 보리 유식물을 녹화시킬 때 마지막 4시간 동안 오존을 처리한(Fig. 1B and E) 후 측정된 광계 I 활성을 나타낸 것이다. 처리한 오존의 농도 증가에 따라 광계 I 활성은 미소하게 감소하였으며 24시간 녹화한 것에서 1.0 ppm의 오존 처리로 약 7% 감소하였다. 이것으로 보아 오존이 광계 I 부위에 미치는 영향은 적었다는 것을 알 수 있다.

Fig. 4는 황백화된 보리 유식물을 녹화시킬 때 마지막 4시간 동안 오존을 처리한(Fig. 1B and E) 후 측정된 광계 II 활성을 나타낸 것이다. 24, 48시간 녹화한 경우 처리한 오존의 농도 증가에 따라 광계 II 활성이 감소하였으며 1.0 ppm의 오존 처리 농도에서 각각의 대조구에 비해 약 51, 45% 감소하였다. 이것으로 보아 오존은 광계 II 활성을 저해함을 알 수 있으며, 48시간 녹화했을 때보다 24시간 녹화했을 때 광계 II 활성이 더 낮게 나타나는 것으로 보아 식물체는 발달 초기에 환경 stress에 민감하게 반응한다는 것을 나타낸다. Coulson과 Heath(1974)는 분리한 엽록체에 오존을 처리하면 광계 I 활성이 광계 II 활성보다 크게 억제된다고 하였으나 본 실험의

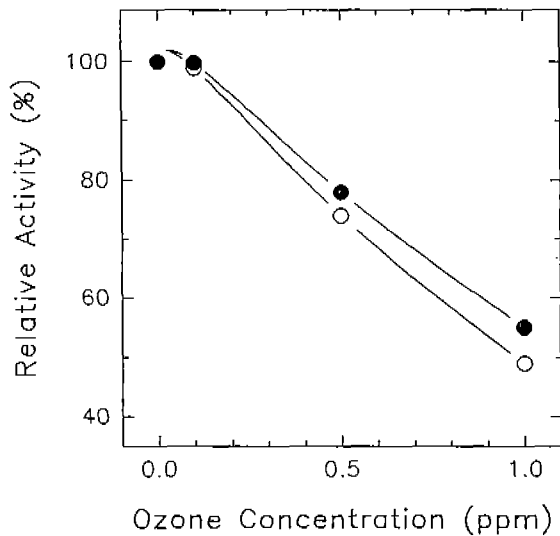


Fig. 4. Effects of the various concentrations of ozone on the levels of oxygen evolution (PS II activity) by isolated chloroplasts. Ozone was treated to barley seedling for the last 4 h during greening periods. The greening periods were 24 h (○) and 48 h (●). The values corresponding to 100% of 24 and 48 h greening were 75 and 120 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively.

Table 2. Recovery of DCPIP photoreduction activity by the treatment of Mn^{2+} , Ca^{2+} and DPC on the barley seedling damaged by Ozone. Ozone was treated for the last 4 h during 48 h greening period

Addition	DCPIP Reduction ($\mu\text{mole} \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	Control	1.0 ppm Ozone
—	75.0(100%)	41.3(55%)
1 $\mu\text{M Mn}^{2+}$	68.7(100%)	38.5(56%)
10 mM Ca^{2+}	72.3(100%)	47.3(65%)
0.15 mM DPC	81.7(100%)	59.9(73%)

Mn^{2+} , $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Ca^{2+} , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

intact 잎에서는 오존이 광계 I보다는 광계 II 부위를 더욱 억제함을 알 수 있었다.

오존이 광계 II의 물분해계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 48시간 녹화할 때 마지막 4시간 동안 1.0 ppm의 오존을 처리한(Fig. 1E) 후 엽록체를 분리하여 DCPIP 광환원율을 측정하였는데, 이 때 반응액에 광계 II 물분해계에 관여하는 Mn^{2+} , Ca^{2+} 그리고 광계 II의 전자공여체인 DPC를 첨가하였다(Table 2). DCPIP 광환원율은 1.0 ppm의 오존을 처리했을 때 대조구보다 약 45% 감소하였으나, 대조구에 Mn^{2+} , Ca^{2+} 및 DPC를 각각 첨가했을 때를 100%로 보았을 때 1.0 ppm의 오존 처리구에서 Mn^{2+} 의 효과는 약 1% 회복되는데 지나지 않았고 Ca^{2+} 은 약 10%, DPC는 약 18%의 회복효과를 나타

내었다. DPC에 의해 활성이 크게 회복된 것으로 보아 오존의 1차적인 억제부위는 광계 II의 산화부위라는 것을 의미하며 (Vernon, and Show, 1969) 특히 Ca^{2+} 에 의해 약 10% 회복된 것으로 보아 물분해계에도 영향을 미치는 것을 알 수 있다(Yocum, 1991). Schreiber(1978)는 잠두콩에 비교적 고농도의 오존을 처리한 후 엽록소 형광 유도 곡선을 분석한 결과 오존에 의한 1차적인 억제부위는 광합성 물분해계에 관여하는 효소라고 한 바 있다.

엽록소 형광

Table 3은 황백화된 보리 유식물을 녹화시킬 때 처음 또는 마지막 4시간 동안 오존을 처리한 후 측정한 엽록소 형광 수치를 나타낸 것이다. 녹화시 처음 4시간 동안 오존을 처리했을 때는 F_o , F_v 및 F_m 이 처리한 오존의 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 감소하였다. 1.0 ppm의 오존을 처리했을 때 24시간 녹화한 경우(Fig. 1A) F_o 와 F_v 그리고 F_m 은 각각의 대조구보다 약 21, 20 그리고 20% 적었으나 48시간 녹화한 경우는(Fig. 1C) 각각의 대조구보다 약 27, 24 그리고 25% 적었다. 오존 처리로 인해 F_o 와 F_v 및 F_m 이 감소한 것은 세포의 괴사로 인해 엽록소 a 분자의 수가 적었기 때문으로 생각된다. F_v/F_o 의 비는 24시간 녹화한 경우 대조구가 3.06이었고 48시간 녹화시에는 대조구가 3.87로 증가하였는데 이것은 엽록체가 발달하면서 광계 II 반응중심의 효율이 증가한 것을 나타낸다. 녹화시킬 때 처음 4시간 오존을 처리한 경우 F_v/F_o 비는 대조구와 유사하였다.

황백화된 보리 유식물을 녹화시킬 때 마지막 4시간 동안 오존을 처리한 후 측정한 엽록소 형광 수치인 F_o , F_v 그리고 F_m 은 처리한 오존의 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 감소하였다. 1.0 ppm의 오존을 처리했을 때 24시간 녹화한 경우(Fig. 1B) F_o , F_v 그리고 F_m 은 각각의 대조구보다 약 5, 44 그리고 27% 적었으며 48시간 녹화한 경우는(Fig. 1E) 각각의 대조구보다 약 3, 28 그리고 23% 적었다. F_o , F_v 및 F_m 은 오존 처리에 의하여 48시간 녹화했을 때보다 24시간 녹화구에서 크게 감소하였다. 그리고 녹화할 때 처음 4시간 동안 오존 처리한 것에 비해서 마지막 4시간 동안 오존 처리했을 때 F_o 의 감소는 미약하였으나 F_v 의 감소는 오히려 크게 나타났다. 그리고 F_v/F_o 비는 처리한 오존의 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 감소하였으며 1.0 ppm의 오존 처리시 48시간 녹화한 경우는 약 25% 감소하였으나 24시간 녹화한 경우 대조구보다 약 30% 감소하였다. 이것은 들뜬 에너지가 광계 II 안테나에 의해 수확된 후 광계 II 반응중심으로 전달되어 광화학반응에 이용되는 효율이 감소하였다는 것을 의미한다(Falk *et al.*, 1992). 그리고 광계 II 반응중심의

Table 3. Effects of the various concentrations of ozone on the levels of chlorophyll fluorescence. Ozone was treated to barley seedling for the first or the last 4 h during greening periods

Ozone treatment and Greening time ^a	Treatment of Ozone	Fluorescence parameters (relative units)			
		Fo	Fv	Fm	Fv/Fo
A	Control	1.60(100%)	4.90(100%)	6.50(100%)	3.063(100%)
	0.5 ppm	1.43(89%)	4.40(90%)	5.83(90%)	3.077(101%)
	1.0 ppm	1.26(79%)	3.94(80%)	5.20(80%)	3.127(102%)
B	0.5 ppm	1.58(99%)	3.69(75%)	5.27(81%)	2.335(76%)
	1.0 ppm	1.52(95%)	3.23(66%)	4.75(73%)	2.125(69%)
C	Control	1.54(100%)	5.96(100%)	6.50(100%)	3.870(100%)
	0.5 ppm	1.26(82%)	4.94(83%)	6.20(83%)	3.937(102%)
	1.0 ppm	1.12(73%)	4.53(76%)	5.65(75%)	4.045(105%)
D	0.5 ppm	1.36(88%)	4.94(83%)	5.83(90%)	3.632(94%)
	1.0 ppm	1.20(78%)	4.10(69%)	5.20(80%)	3.417(88%)
E	0.5 ppm	1.50(97%)	5.00(84%)	6.50(87%)	3.333(86%)
	1.0 ppm	1.49(97%)	4.31(72%)	5.80(77%)	2.893(75%)
F	Control	1.49(100%)	6.01(100%)	7.50(100%)	4.034(100%)
	0.5 ppm	1.40(94%)	5.40(90%)	6.20(83%)	3.857(96%)
	1.0 ppm	1.26(85%)	4.64(77%)	5.65(75%)	3.683(91%)

^aOzone treatment and greening time were explained in materials and methods (Fig. 1).

효율에 미치는 영향은 48시간 녹화한 것에 비해서 24시간 녹화한 경우에 크게 나타남을 알 수 있었다. Harris와 Heber (1993)는 일반적으로 Fo가 감소하는 것은 광계 II 반응중심의 색소에서 흡수한 에너지가 광계 II 반응중심으로 전달되지 않고 열로 소모되는 경로가 확대될 때 일어난다고 한 바 있다. 따라서 엽록체가 발달할 때 오존을 처리하고 측정된 Fo의 감소는 Fv/Fo의 감소도 동반하였으므로 광계 II 반응중심 색소에서 흡수한 에너지가 광계 II 반응중심으로 전달되지 않고 열로 소모되는 경로가 확대된 것으로 생각된다.

오존에 의한 억제 영향이 회복되는 것을 알아보기 위하여 오존을 처리한 후 24시간 뒤에 엽록소 형광을 측정된 결과(Fig. 1D, F) Fo는 24, 48시간 녹화한 경우 오존을 처리하고 바로 측정했을 때 각각 약 5%와 3%만 감소하였으나 24시간 뒤에 측정했을 때는 대조구보다 각각 약 22%와 15%나 감소하였다. Fv/Fo 비는 24시간(Fig. 1D)과 48시간(Fig. 1F) 녹화한 경우 1.0 ppm의 오존을 처리했을 때 대조구보다 각각 약 30%와 25% 감소하였으나 24시간 뒤에 측정했을 때는 각각 대조구에 비해 약 12%와 9%만이 적었으므로 광계 II 반응중심의 효율은 크게 회복되었다. 이것으로 보아 오존에 의해 세포의 피사와 엽록소의 파괴가 일어나서 시간이 지남에 따라 그 증상이 나타났으며 또한 광계 II 반응중심의 색소에서 흡수한 에너지가 광계 II 반응중심으로 전달되지 않고 열로 소모되는 경로가 확대된 것으로 생각된다. 저농도의 오존이 초본 식물과 목본 식물에 미치는 가시적인 영향을 이용하여 지표종으로

활용하고 있으나(Shimizu *et al.*, 1993a,b) 객관적으로 측정이 가능한 엽록소 형광(Fo)을 측정하여 봄으로써 환경 오염물질, 특히 비교적 고농도의 오존에 의한 stress를 단기간에 식물체가 받았는지를 알 수 있을 것으로 생각된다.

오존처리로 엽록체 광합성 기구의 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실온에서 엽록소 형광을 유도한 후 형광 소멸 요인을 분석하였다(Table 4). 녹화시 처음 4시간 오존을 처리한 경우 24, 48시간 녹화했을 때 qP, qR 그리고 qNP는 미소한 변화만 관찰되었으나, 텔라코이드막을 경계로한 ΔpH에 의해 나타나는 에너지 의존적인 형광 소멸인 qE는 24시간 녹화하였을 때 처리한 오존의 농도가 0.5 ppm에서 1.0 ppm으로 증가함에 따라 크게 감소하였는데 1.0 ppm의 오존 처리시 24시간 녹화한(Fig. 1A) 경우 대조구에 비해 약 48%나 감소하였으나 48시간 녹화구에서는(Fig. 1C) 약 20%만 감소하였다(Table 4). 본 실험의 데이터에는 나타나 있지 않았지만 본 실험과 같은 조건에서 황백화된 보리 유식물을 12-24시간 녹화할 때 qE는 크게 증가하였지만 36-48시간 녹화하면 qE는 미소한 증가만 관찰되었다. 그러므로 1.0 ppm 오존처리시 48시간 녹화구에서 보다 24시간 녹화구에서 qE의 감소폭이 큰 것은 처리한 오존으로 인해 엽록체의 발달이 지연되었다는 것을 나타낸다.

녹화할 때 마지막 4시간 동안 오존을 처리하여 엽록소 형광 소멸을 분석한 결과 1.0 ppm의 오존을 처리했을 때 qP는 24시간 녹화한 경우(Fig. 1B) 대조구보다 약 35% 감소하였고 48

Table 4. Effects of the various concentrations of ozone on the levels of fluorescence quenching coefficients derived from the chlorophyll fluorescence induction curves. Ozone was treated to the barley seedling for the first or the last 4 h during greening periods

Ozone treatment and Greening time ^a	Treatment of Ozone	Fluorescence parameters (relative units)			
		qP	qNP	qR	qE
A	Control	0.55(100%)	0.65(100%)	0.59(100%)	0.34(100%)
	0.5 ppm	0.59(107%)	0.63(97%)	0.62(105%)	0.26(77%)
	1.0 ppm	0.63(115%)	0.62(95%)	0.65(110%)	0.14(41%)
B	0.5 ppm	0.45(82%)	0.60(92%)	0.50(85%)	0.30(88%)
	1.0 ppm	0.36(66%)	0.52(80%)	0.37(63%)	0.26(77%)
C	Control	1.52(100%)	0.73(100%)	0.40(100%)	0.60(100%)
	0.5 ppm	0.55(106%)	0.70(96%)	0.42(105%)	0.54(90%)
	1.0 ppm	0.58(112%)	0.68(93%)	0.45(113%)	0.48(80%)
D	0.5 ppm	0.51(98%)	0.71(97%)	0.38(95%)	0.55(92%)
	1.0 ppm	0.52(100%)	0.67(92%)	0.37(93%)	0.50(83%)
E	0.5 ppm	0.44(85%)	0.69(95%)	0.33(83%)	0.56(93%)
	1.0 ppm	0.37(71%)	0.63(86%)	0.26(65%)	0.51(85%)
F	Control	0.48(100%)	0.77(100%)	0.35(100%)	0.63(100%)
	0.5 ppm	0.50(104%)	0.75(97%)	0.34(97%)	0.59(94%)
	1.0 ppm	0.51(106%)	0.73(95%)	0.33(94%)	0.56(89%)

^aOzone treatment and measurement were explained in materials and methods (Fig. 1).

시간 녹화한 경우는(Fig. 1E) 대조구보다 약 29% 감소하였으며, qR은 24시간 녹화된 것의 대조구보다 약 37% 감소하였으나 48시간 녹화했을 때는 대조구보다 약 35%나 감소하여 비교적 크게 감소하였다. 그러나 비광화학적 형광소멸을 나타내는 qNP는 24시간 녹화한 경우 대조구보다 약 20% 감소하였고 48시간 녹화했을 때는 대조구보다 약 14% 감소하였으며, qE는 24시간 녹화한 경우 대조구보다 약 23% 감소하였으나 48시간 녹화했을 때 대조구보다 약 15% 감소하였다. Quinone의 산화환원 상태를 나타낸 것으로 광계 II 반응중심의 열람 상태를 반영하는 qP가 크게 감소한 것으로 보아 오존 처리로 인해 Q_A와 Q_B의 산화가 억제됨을 알 수 있다(Chun *et al.*, 1993). Q_A와 Q_B의 산화가 억제된다는 것은 CO₂ 고정 반응이 억제되어 ATP와 NADPH가 축적되므로 quinone 이후로 전자전달이 억제되어 Q_A와 Q_B가 환원 상태로 유지된다는 것을 나타낸다.

오존에 의한 억제 영향이 회복되는 것을 알아보기 위하여 녹화도중 오존을 처리한 후 24시간 뒤에 측정(Fig. 1D and F) 엽록소 형광 소멸 요인을 분석한 결과 오존 처리 후 즉시 측정했을 때 qP와 qR이 크게 감소하였으나 24시간 후에 측정했을 때는 qP가 대조구와 유사하게 회복되었으며, 24시간 녹화구에서 마지막 4시간 동안 1.0 ppm의 오존을 처리한 후 즉시 측정했을 때(Fig. 1B) qR은 약 63%로 감소되었고 qE는 약 77%로 감소되었으나 24시간 뒤에 측정했을 때는(Fig. 1D)

qR이 약 93% 수준으로 회복되었으며 qE는 약 83%로서 거의 회복되지 않았다.

이상의 실험에서 오존이 보리 유식물의 녹화 초기에는 24시간 녹화구에서 엽록소 함량, Fo, Fv 그리고 qE를 감소시켰으나 48시간 녹화구에서는 많이 회복되었다. 그리고 오존이 녹화 중기에 엽록소 함량에 미치는 영향은 적었으나 광계 II 활성을 크게 감소시켰으며 광계 II 전자 공여체인 DPC의 첨가로 활성이 크게 회복되어 광계 II 산화부위를 크게 손상시킨 것을 알 수 있었다. 엽록소 형광 변화에서 Fv, Fm 및 Fv/Fo가 크게 감소하였으며 형광 소멸요인 중 qP와 qR이 크게 감소하였으나 qNP와 qE는 상대적으로 감소의 폭이 작았다. 그리고 오존 처리 후 24시간 뒤에 엽록소 형광을 측정했을 때 특이하게 Fo가 크게 감소하였다. 이것으로 미루어 보아 오존은 보리 유식물의 녹화 초기에는 세포를 괴사시키고 엽록체의 발달을 지연시키며, 녹화 중기에는 엽록체의 광계 II 산화부위를 주로 억제하며 광계 II 환원부위도 억제시키는 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 1994년도 교육부 기초과학육성연구비 BSRI-94-4404의 지원에 의한 것이다.

인용문헌

- Arnon, D.** 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Atal, N., P.P. Saradhi and P. Mohanty.** 1991. Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedling with low concentrations of cadmium: Analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. *Plant Cell Physiol.* **32**: 943-951.
- Chun, H.S., B.Y. Moon, C.H. Lee, I.K. Chung, I.H. Park and C.H. Lee.** 1993. Light-dependent chilling injury on the photosynthetic activities of cucumber cotyledons. *Korean J. Bot.* **36**: 133-140.
- Coulson, C. and R.L. Heath.** 1974. Inhibition of the photosynthetic capacity of isolated chloroplasts by ozone. *Plant Physiol.* **53**: 22-38.
- Critchley, C.** 1981. Studies on the mechanism of photo-inhibition in higher plants. I. Effects of high light intensity on chloroplast activities in cucumber adapted to low light. *Plant Physiol.* **67**: 1161-1165.
- Driesehaar, A.R.J., U. Schreiber and S. Malkin.** 1994. The use of photothermal radiometry in assessing leaf photosynthesis: II. Correlation of energy storage to photosystem II fluorescence parameters. *Photosynth. Res.* **40**: 45-54.
- Eckey-Kaltenbach, H., D. Ernst, W. Heller and H. Sanderann, Jr.** 1994. Biochemical plant responses to ozone. IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants. *Plant Physiol.* **104**: 67-74.
- Falk, S., J.W. Leverenz, G. Samuelsson and G. Quist.** 1992. Changes in photosystem II fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to increasing levels of irradiance in relationship to the photosynthetic response to light. *Photosynth. Res.* **31**: 31-40.
- Harris, G.C. and U. Heber.** 1993. Effects of anaerobiosis chlorophyll fluorescence yields in spinach (*Spinacia oleracea*) leaf discs. *Plant Physiol.* **101**: 1169-1173.
- Heath, R.L.** 1994. Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynth. Res.* **39**: 439-451.
- Hiscox, J.D. and G.F. Israelstam.** 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* **57**: 1332-1334.
- Liaaen-Jensen, S. and A. Jensen.** 1971. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. In *Method in Enzymology*. Vol. 23. A. San Pietro (ed.). Academic Press, New York, pp. 586-602.
- Laisk, A., O. Kull and H. Moldau.** 1989. Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiol.* **90**: 1163-1167.
- Oxborough, K. and P. Horton.** 1988. A study of the regulation and function of energy-dependent quenching in pea chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta.* **934**: 135-143.
- Reich, P.B., J.P. Lassoie and R.G. Amundson.** 1984. Reduction in growth of hybrid poplar following field exposure to low levels of O₃ and(or) SO₂. *Can. J. Bot.* **62**: 2835-2841.
- Rosemann, D., W. Heller and H. Sanderann, Jr.** 1991. Biochemical plant responses to ozone. II. Induction of stilbene biosynthesis in scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **97**: 1280-1286.
- Sakaki, T., K. Tanaka and M. Yamada.** 1994. General metabolic changes in leaf lipids in response to ozone. *Plant Cell Physiol.* **35**: 53-62.
- Saurer, M., J. Fuhrer and U. Siegenthaler.** 1991. Influence of ozone on the stable carbon isotope composition, δ¹³C, of leaves and grain of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* **97**: 313-316.
- Schreiber, U.** 1978. Chlorophyll fluorescence assay for ozone injury in intact plants. *Plant Physiol.* **61**: 80-84.
- Shimizu, H., H.S. Ko, K. Kubota, I.S. Wui and K. Omasa.** 1993a. Effects of low concentrations of ozone on the growth of morning glory, radish and sunflower plants. *J. Agr. Met.* **48**: 727-730.
- Shimizu, H., Y. Fujinuma, K. Kubota, T. Totsuka and K. Omasa.** 1993b. Effects of low concentrations of ozone on the growth of several woody plants. *J. Agr. Met.* **48**: 723-726.
- Terashima, I., L.K. Huang and C.B. Osmond.** 1989. Effects of leaf chilling on thylakoid functions, measured at room temperature, in *Cucumis sativus* L. and *Oryza sativa* L. *Plant Cell Physiol.* **30**: 840-850.
- Vernon, L.P. and E.R. Show.** 1969. Photoreduction of 2,6-dichlorophenol-indophenol by diphenylcarbazide. A photosystem II reaction catalyzed by tris-washed chloroplasts and subchloroplast fragment. *Plant Physiol.* **44**: 1645-1649.

(1995. 9. 4 接受)

Effects of Ozone on Photosynthetic Activity in Chloroplast of
Barley (*Hordeum vulgare* L.)

Park, Kang Eun, Hwa Sook Chung*, Seung Dal Song¹,
Kwang Soo Roh² and Jong Suk Song³

Department of Biology Education, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea;

¹Department of Biology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea;

²Department of Biology, Keimyong University, Taegu 704-701, Korea; and

³Department of Biology, Andong National University, Taegu 760-749, Korea

ABSTRACT

The effects of 0.5 and 1.0 ppm of ozone on the developing chloroplast of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedling during greening were investigated by PSI and II activities, chlorophyll fluorescence, and the contents of chlorophyll. Etiolated barley seedling was treated 0.5 and 1.0 ppm ozone for the first 4 h during greening. In 24 h greening experiment, the contents of chlorophyll were decreased by increasing ozone concentration from 0.5 ppm to 1.0 ppm. In 24 h greening experiment, Fo, Fv, Fm and qE were greatly decreased as the concentration of ozone was increased, but those were not considerably decreased in 48 h greening experiment. In another experiment, the developing barley seedling was treated with 0.5 and 1.0 ppm ozone for the last 4 h during greening period, which was 24 h or 48 h. In both experiments the PS II activity was decreased as the concentration of ozone was increased, but not in PS I activity. Fv, Fm and Fv/Fo were also decreased as the concentration of ozone was increased. qP and qR were strikingly decreased as the concentration of ozone was increased in both experiments.

Keywords : ozone, barley seedling, greening, chlorophyll fluorescence, PS II oxidation site

*Corresponding author: Fax +82-53-950-6809