

인공 산성비가 소나무속의 동위효소 양상에 미치는 영향

윤 의 수

공주대학교 자연과학대학 생물학과

Isozyme Variants in Genus *Pinus* by Simulated Acidic Rain

Eui Soo Yoon

Department of Biology, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

ABSTRACT

The effect of acid rain on plant isozyme response was studied with the treatment of simulated acid rain to *Pinus densiflora*, *P. nigida* and *P. koraiensis* for 9 months. The isozyme pattern of α -Esterase(α -Est), Peroxidase(POD) and Glutamate dehydrogenase(GDH) were observed in the control (pH 5.6) and simulated acid rain (pH 3.5) treatment. No changes of isozyme pattern in α -Est was observed in *P. densiflora* after 9 month treatment of simulated acid rain, but, two new isozymes were activated in *P. nigida* in the same treatment. In *P. koraiensis*, two new isozyme were activated but five isozymes were not activated. *P. densiflora* did not show any difference in POD and GDH after the treatment of simulated acid rain. *P. nigida* showed activation of eight and two isozymes in POD and GDH, respectively. *P. koraiensis* showed inactivation of 4 isozymes in POD but showed no changes in GDH.

Key words: α -Esterase, glutamate dehydrogenase, peroxidase, *Pinus densiflora*, *P. koraiensis*, *P. nigida*, simulated acid rain,

서언

모든 생물종에 있어서 유전자형이 같다고 하더라도 발현하는 표현형은 반드시 같지는 않다. 따라서 유전자 발현의 문제를 효소 수준에서 취급한다고 하는 점에서 동위효소의 연구는 매우 중요하다. 옥수수의 유근을 초기적 상태와 혐기적 상태에 두었을 때의 동위효소의 양상에 관한 연구(Freeling과 Schwartz, 1973), 보리의 잎의 변이에 따른 동위효소의 활성 연구(Price와 Stebbins, 1971), 포도의 염록체로부터 추출한 동위효소에 대한 pH의 선처리 효과(Lerner 등, 1972) 등 stress에 대한 유전자의 발현을 연구하는 유력한 방법으로서 이용되고 있으며, 종의 지역간의 차이에 대한 연구(Yoon 등, 1988), 종간의 동정에 관한

연구(Bingham과 Yeh, 1971), 재배에 따른 연구(Bassiri와 Rouhent, 1977; Bringhurst 등, 1981), 균교배에 관한 연구(Stuber와 Goodman, 1982), 이수체에 관한 연구(Morikawa, 1978; Moore와 Collins, 1982) 등에 사용되고 있다. Endo(1972)는 쌀의 Peroxidase에 대한 연구를 보고하였으며 Zamir 등(1981)은 온도 변화에 따른 alcohol dehydrogenase의 zymogram을 보고하였고 (Endo, 1972). Kahler와 Allard(1970)는 보리에서 Esterase의 zymogram을 보고하였다. 최근에는 식물체에 있어서 여러 가지 스트레스에 의하여 동위효소의 양상이 달라짐을 연구하고(Bassiri와 Carlson, 1979), 특징적인 효소에 대한 cDNAs의 클로닝과 특징에 대한 연구들이 시도되고 있다(Huh 등, 1977; Lalonde 등, 1997). 또한 식물의 기내 배양을 통하여서도 기내의 여러 가지 스트레스에 의해 동위효소의 활성이 변하

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(기초과학, BSRI-96-4442)에 의하여 수행 되었음.

다는 연구 보고(Takeda 등, 1990; Kwak 등, 1994; Kim 등, 1994; Yamada 등, 1987; Mader와 Walter, 1986)도 있다.

산성비는 육상 생태계에서 토양과 식물에 여러 가지 심각한 영향을 미친다. Singh 등(1992)은 *Vicia faba*에 미치는 인공 산성비의 영향에 대해 보고하였다. Garty(1995)는 지의류가 공기중에 포함된 H_2SO_4 , $NaHSO_4$ 에 의해 나타나는 ethylene의 생성량을 조사하였으며, Berglund 와 Eversmann(1988)는 인공 산성비의 pH 수준에 따른 조류의 세포질 유동에 대하여 연구하였다. 또한 산성비에 의한 강낭콩, 노란자작나무의 생장(Ferenbaugh, 1976; Hindawi 등, 1980), 송백류의 종자 발아와 유식물의 발생에 대한 영향(Brakke, 1976; Raynall 등, 1982), 또한 은행나무와 곰솔의 산성비에 대한 생장 반응(Kim과 Soh, 1995; Kim과 Soh, 1994) 등의 많은 연구들이 있다.

산성비가 소나무속에 있어서의 생장 반응에 미치는 영향에 대한 연구는 여러 연구자들에 의하여 수행되고 있다(Braekke, 1976; Raynall 등, 1982; Haines 등, 1980, 1985; Abouguendia와 Baschak, 1987; Wood와 Bormann, 1977; McColl과 Johnson, 1983; Gordon, 1972; Maurice와 Crang, 1986; Percy와 Baker, 1986; Kim, 1991; Lee와 Weber, 1979; Kim과 Soh, 1994, 1995). 그러나 소나무의 동위효소와 유전자에 대한 연구는 별로 많지 않으며(Mehan과 Malik, 1976; Dharmawardhana 등, 1995; Karmali와 Santos, 1988; Yang 등, 1996; Powell 등, 1995; Bosatherini 등, 1994; Rubanovich와 Kal'chenko, 1994; Loukas 등, 1983) 그 중에서도 산성비에 대한 연구는 거의 없다.

식물체에서 동위효소는 일반적으로 상처나 급격한 환경 변화, 공기 오염물 등의 비생물학적 스트레스에 의해 그 활성이 변한다(Endress 등, 1980; Bowles, 1990). 본 연구에서는 비생물학적 스트레스의 하나인 인공 산성비가 소나무속의 소나무와 리기다 소나무, 잣나무의 α -Esterase(α -Est), Peroxidase(POD), Glutamate dehydrogenase(GDH) 동위효소 양상 변화에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 소나무, 리기다 소나무, 잣나무는 공주대학교에서 심어져 있는 식물 중에서 키가 2m 정도 되는 것을 6그루 씩 택하였다. 1996년 8월부터 1997년 5월까지 3그루에는 pH 3.5인 인공 산성비를, 다른 3그루는 pH 5.6인 인공비를 매주 월, 수, 금요일에 오전 10시경에 5분씩 분무하였다. 인공 산성비의 성분은 1N 황산(H_2SO_4)과 질산(HNO_3)을 3:1(v/v)의 비율로 혼합하여 2차 증류수로 조제하였다. 인공 산성비의 pH는 증류수로 희석하여 HI 8314 membrane pH meter로 pH 3.5와 pH 5.6으로 조정하였으며 pH 5.6을 오염되지 않은 강우인 대조구로 하였다. 1996년 10월(인공 강우 처리후, 2개월째)과 1997년 5월(인공강우 처리후, 9개월째)의 것의 잎을 각각의 개체에서 채취하여 본 실험에 이용하였다.

방법

1) 단백질 추출

Sample을 액체 질소에 넣어 각각 막자 사발로 분쇄한 후, homogenizer로 10초씩 3회 homogenize시킨 후 동결건조기로 건조하였다. Sample이 완전히 건조된 후 0.5mg씩 eppendorf tube에 넣어 약 -25°C에서 보존하였다. 영동을 위하여 보존한 eppendorf tube에 O'Farrell buffer(O'Farrell, 1975)를 넣고 vortex시킨 후 30분간 실온에 방치한다. 4°C에서 15000rpm으로 15분간 원심분리해서 상등액을 취하여 10μl씩 eppendorf tube에 분주하여 전기영동 시료로 사용하였다.

2) 등전점 전기영동

Polyacrylamide gel 등전점 전기영동(IEF-PAGE)은 Arulsekhar와 Parfitt(1986)의 방법을 변형하여 실시하였다. Gel은 표 1과 같이 만들어 gel caster에 붇는다. 전기영동은 7cm × 22cm × 0.5mm 규격의 수평형 전기영동장치로 행하였다. strip 조각을 중앙에 일렬로 배열하고 10μl의 샘플을 적가한 다음 200V에서 5분, 400V

Table 1. Composition of gel in isoelectric focusing(IEF)

acrylamide IEF	2.4 ml
Bis-acrylamide	1.5 ml
Ampholine	1.0 ml
Glycerol	2.0 ml
D.D.W	12.6 ml
10% Ammonium proxidesulfate	100 μl
TEMED	40 μl

Table 2. Staining Recipes for three enzymes used.

Enzymes	Recipe
α -Esterase	0.2M Phosphate buffer, pH 7.0
	α -naphthyl acetate
	Fast blue RR salt
Incubate the gel at 30°C for 4~8 hours in the dark.	
Peroxidase	3-amino-9-ethylcarbazol
	Dimethyl formamide
	Na-acetate buffer (0.2M pH 5.6)
	Caco (0.1M)
	30% H ₂ O ₂
	D.D.W
Incubate the gel at 30°C for 10~30 minutes in the dark.	
Glutamate dehydrogenase	0.5M Tris-HCl, pH 7.0
	Glutamic acid
	NAD
	MTT
	PMS
Up to D.D.W 100ml	
Incubate the gel at 30°C for 1~2 hour in the dark.	

에서 5분, 800V에서 10분, 1,000V에서 45분간 전개시킨 후 1,500V에서 3시간 동안 전개시켰다. 이때, 전극액은 +극 측에 0.04M aspartic acid 액을, -극 측에 1M NaOH를 사용하였다.

Table 3. Pholymorphic variants are revealed polyacrylamide gel electrophoresis in *P. densiflora*, *P. nigida* and *P. koraiensis*.

No. of Isozymes	α -Esterase																			Peroxidase										Glutamate dehydrogenase											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	1	2	3	4
<i>P. densiflora</i>	A	+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																			+			
	B	+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																			+			
	C	+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																			+			
	D	+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																			+			
<i>P. nigida</i>	E	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																		+	+	+	+	
	F	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	+	+	+	+		
	G	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																	+	+	+	+		
	H	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>P. koraiensis</i>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	J	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	K	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

3) 동위효소 염색

α -Esterase(α -EST, EC. 3. 1. 1. 1), Peroxidase(POD, EC. 1. 11. 1. 7), Glutamate dehydrogenase(GDH, EC. 1. 4. 1. 2) 동위효소의 염색법은 표 2와 같다(Kahler, 와 Allard, 1970; Endo, 1972; Hartmann 등, 1973). 염색이 끝난 후 gel를 잘 펴서 gel dry에 1시간 동안 약 70°C에서 말렸다

결과

1. α -Esterase

pH 3.5 ~ 7.0의 범위에서 총 20개의 band가 보여졌다. 소나무 잎에서는 band 수가 11개, 리기다 소나무 잎에서는 9개, 잣나무 잎에서는 총 13개의 band가 검출되었으며, 6번과 9번 두 개의 band는 pH 3.5 인공 산성비의 처리유무나 처리기간에 관계없이 소나무, 리기다 소나무, 잣나무의 잎 모두에서 공통으로 보여졌다. 소나무 잎에서는 인공 산성비의 처리의 유무나 처리기간에 관계없이 11개의 band가 모두 공통으로 보여졌으나 pH 3.5 인공 산성비를 9개월간 처리한 구의 18번 band가 더 강한 활성도를 보였다. 리기다 소나무 잎에서 보여진 10개의 band 중 8개가 공통으로

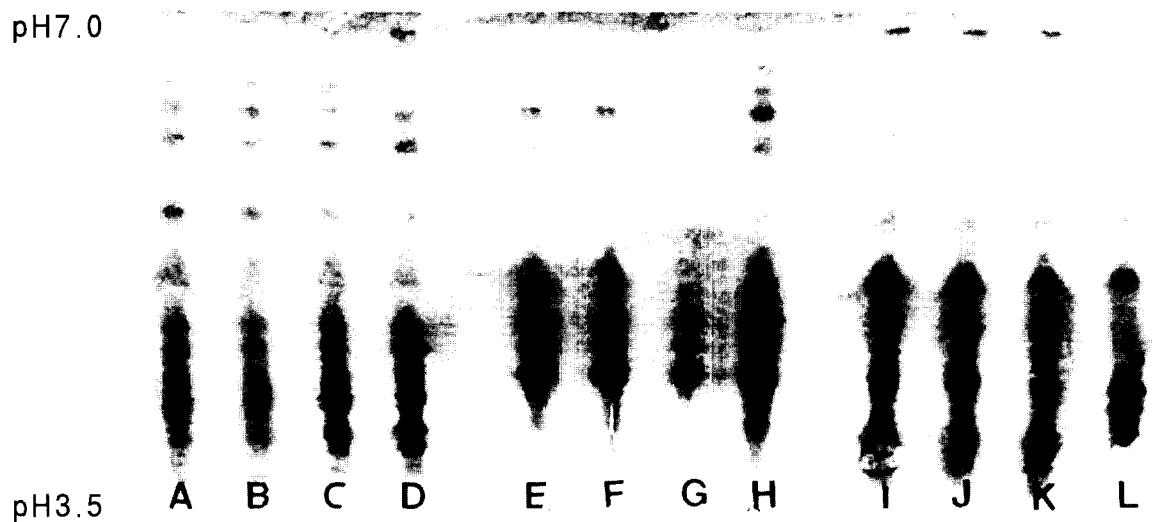


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoretic zymograms of α -Esterase.

A, B, C, D; *P. densiflora*, E, F, G, H; *P. nigida*, I, J, K, L; *P. koraiensis*. A, E, I, with 3 month treated for simulated rain pH 5.6. B, F, J, with 3 month treated for simulated rain pH 3.5. C, G, K, with 10 month treated for simulated rain pH 5.6. D, H, L, with 10 month treated for simulated rain pH 3.5.

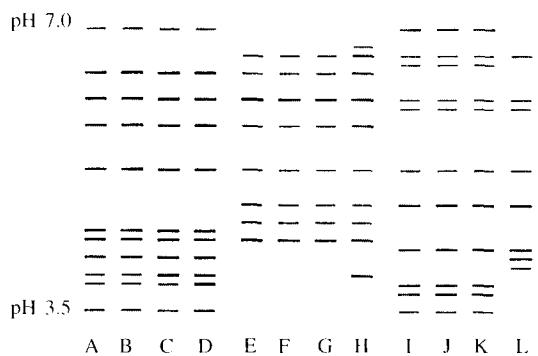


Fig. 2. Electrophoretic patterns of α -Esterase.

A, B, C, D; *P. densiflora*, E, F, G, H; *P. nigida*, I, J, K, L; *P. koraiensis*. A, E, I, with 3 month treated for simulated rain pH 5.6. B, F, J, with 3 month treated for simulated rain pH 3.5. C, G, K, with 10 month treated for simulated rain pH 5.6. D, H, L, with 10 month treated for simulated rain pH 3.5.

보여졌으며 2번 band 와 17번는 인공 산성비를 9 개 월간 처리한 구에서만 보여졌다. 또한 3, 5, 6번째 band와 17번 band가 pH 3.5 인공산성비를 9개월간 처리한 구에서 더 강한 활성도를 보였다. 잣나무 잎에서는 모두 13개의 Band가 보였으며 3, 6, 7, 9, 10, 14 번 band는 공통으로 보여져으나 1, 4, 18, 19, 20번 band는 pH 3.5 인공 산성비를 9개월간 처리한 구에서는

보여지지 않았다. 또한 15, 16번 band는 pH 3.5 인공 산성비를 9 개월간 처리한 잣나무 잎에서만 보여졌을 뿐 아니라 강한 활성도를 보였다(표 3, 그림 1, 2).

2. Peroxidase

pH 3.5 ~ 10.0 사이에서 총 17개의 band 가 보여졌으며 pH 3.5의 인공 산성비의 처리 유무나 처리기간에 관계 없이 소나무, 리기다 소나무, 잣나무의 잎에서 공통으로 보여지는 band는 없었다. 소나무 잎은 pH 3.5의 인공 산성비의 처리 유무나 처리 기간에 관계없이 모두 2개의 band가 보였다. 리기다 소나무 잎에서는 총 11개의 band가 보여졌으며 11, 13, 15, 16 번 band는 인공 산성비의 처리유부에 관계없이 모든 잎에서 나타났으나 활성도는 pH 3.5 인공 산성비를 9 개월간 처리한 구에서 더욱 강하게 나타났다. 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 17번 band는 9개월간 pH 3.5의 인공 산성비를 처리한 리기다 소나무의 잎에서만 검출되었다. 잣나무에서는 총 9개의 band가 보였으며 2, 4, 5, 10, 17번 band는 pH 3.5의 인공 산성비의 처리 유무나 처리기간에 관계없이 공통으로 보여졌으나, pH 3.5 인공 산성비를 처리한 구에서 4번과 5번 17번 band가 더욱 강하게 검출되었다. 또한 11, 12, 13, 14

pH10.0

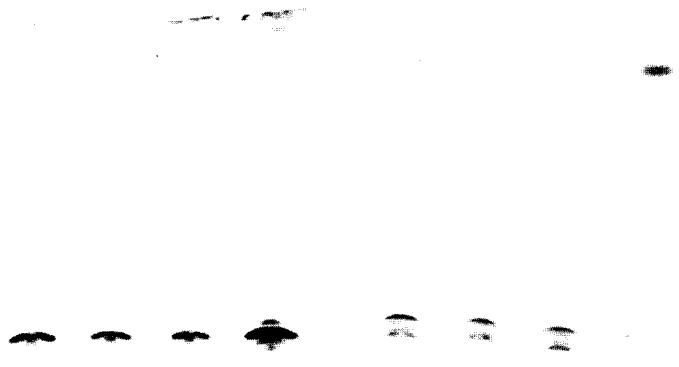


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoretic zymograms of Peroxidase.

A, B, C, D; *P. densiflora*, E, F, G, H; *P. nigida*, I, J, K, L; *P. koraiensis*, A, E, I, with 3 month treated for simulated rain pH 5.6, B F, J, with 3 month treated for simulated rain pH 3.5, C, G, K, with 10 month treated for simulated rain pH 5.6, D, H, L, with 10 month treated for simulated rain pH 3.5.

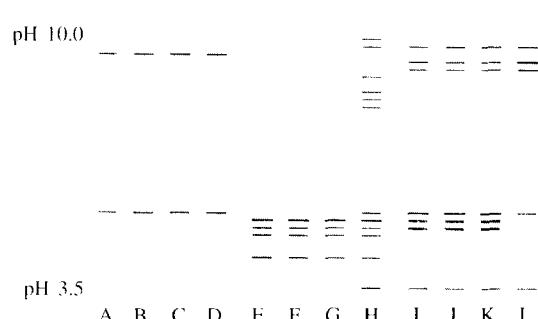


Fig. 4. Electrophoretic patterns of Peroxidase.

A, B, C, D; *P. densiflora*, E, F, G, H; *P. nigida*, I, J, K, L; *P. koraiensis*, A, E, I, with 3 month treated for simulated rain pH 5.6, B F, J, with 3 month treated for simulated rain pH 3.5, C, G, K, with 10 month treated for simulated rain pH 5.6, D, H, L, with 10 month treated for simulated rain pH 3.5.

번 band는 pH 3.5 인공 산성비를 처리한 잣나무의 잎에서는 검출되어지지 않았다(표 3, 그림 3, 4).

3. Glutamate dehydrogenase

pH 3.5 ~ 6.0 사이에서 총 4개의 band가 검출되었으며 소나무, 리기다 소나무, 잣나무 모두에서 공통으로 보여지는 band는 없었다. 소나무 잎에서는 pH 3.5 인공 산성비의 처리유무나 처리시기에 관계없이

하나의 band가 모두 공통적으로 나타났다. 리기다 소나무 잎은 1번과 2번 band가 pH 3.5 인공 산성비의 처리 유무나 처리 기간에 관계 없이 공통으로 검출되었으며, 3번 Band는 pH 3.5 인공 산성비를 2개월 처리한 구와 9개월 처리한 구에서만 나타났다. 또한 4번 band는 pH 3.5 인공 산성비를 9개월 처리한 구에서만 나타났다. 잣나무의 잎은 1, 2, 3 번 band가 pH 3.5 인공 산성비의 처리 유무나 처리 기간에 관계 없이 공통으로 검출되었다(표 3, 그림 5, 6).

고찰

소나무, 리기다 소나무, 잣나무의 동위효소 패턴을 전기영동으로 분석한 결과 소나무에 있어서는 pH 3.5의 인공 산성비의 처리유무나 처리 기간에 관계 없이 α -Est의 동위효소는 큰 차이를 보이지 않았다. 다만 산성비를 장기간 처리한 소나무의 잎에서 더 강한 동위효소의 활성도가 보여졌다. 리기다 소나무의 잎에 있어서는 산성비를 장기간 처리한 잎에서 강한 동위 효소의 활성이 보여졌을 뿐 아니라 활성을 갖는 새로운 동위효소 2개가 강하게 나타났다. 잣나무의 잎의 경우에는 반대로 산성비를 장기간 처리했을 때 5가지의 동위 효소의 활성이 없거나 약하여지고 반대로 새로운 2가지의 동위 효소가 강한 활성을

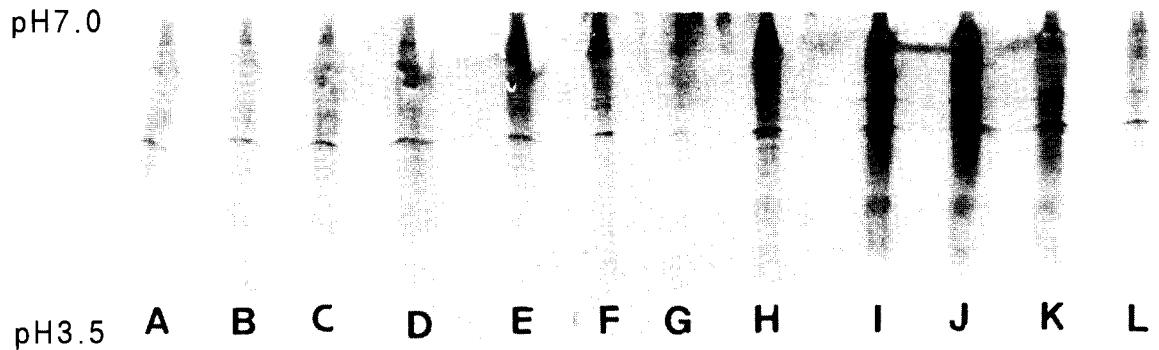


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoretic zymograms of Glutamate dehydrogenase

A, B, C, D; *P. densiflora*, E, F, G, H; *P. nigida*, I, J, K, L; *P. koraiensis*, A, E, I, with 3 month treated for simulated rain pH 5.6, B F, J, with 3 month treated for simulated rain pH 3.5, C, G, K, with 10 month treated for simulated rain pH 5.6, D, H, I, with 10 month treated for simulated rain pH 3.5.

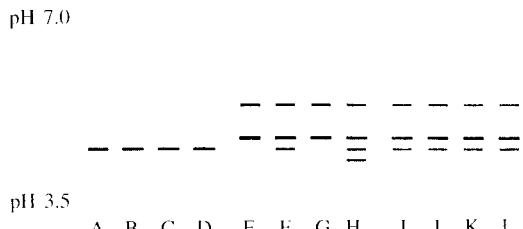


Fig. 6. Electrophoretic patterns of Glutamate dehydrogenase, A, B, C, D; *P. densiflora*, E, F, G, H; *P. nigida*, I, J, K, L; *P. koraiensis*, A, E, I, with 3 month treated for simulated rain pH 5.6, B F, J, with 3 month treated for simulated rain pH 3.5, C, G, K, with 10 month treated for simulated rain pH 5.6, D, H, L, with 10 month treated for simulated rain pH 3.5.

보였다. POD 동위효소들에 있어서도 소나무의 잎은 산성비에 의해 동위효소의 활성이 거의 없으나, 리기가 소나무 잎은 8종류의 새로운 동위효소의 활성이 보여지고 있으며 또한 공통으로 나타나는 동위효소들도 그 활성이 강하게 보여지고 있다. 또한 잣나무 잎의 경우에는 α -Est 동위효소의 경우와 마찬가지로 4종류의 동위효소의 활성이 없어지고 공통으로 보여지는 동위효소의 활성도 큰 변화를 보였다. GDH 동위효소들에 있어서는 역시 소나무에 있어서는 변화가 없으며, 리기가 소나무의 경우에는 산성비를 2개월 처리한 잎에서도 새로운 동위효소가 하나 보여졌으며 9개월간 처리한 잎에서는 또 하나의 동위효소 활성이 나타났다. 그러나 잣나무의 경우에 있어서는

α -Est 와 POD 동위효소와는 달리 동위효소의 종류에는 변화가 없었으나 그 활성에 있어서는 약해졌다. 이러한 결과는 같은 소나무 속일지라도 그 종에 따라 산성비에 대한 감수성이 상당히 차이가 있음을 나타낸다. 동위효소 패턴의 변화로 볼때 소나무는 대체로 산성비에 큰 영향을 받지 않으나 리기다 소나무는 POD 나 GDH 동위효소의 활성에 큰 영향을 받으며 잣나무의 경우에는 α -Est 나 POD 동위효소가 영향을 강하게 받고 있음을 알 수 있다. 이 결과로 볼때 소나무는 비교적 산성비에 큰 영향을 받지 않으나, 리기다 소나무나 잣나무는 산성비에 많은 영향을 받음을 알 수 있다.

산성비는 송백류의 종자 발아와 유식물의 발생에 영향을 미치며(Braekke, 1976; Percy, 1986) 스트로부스 소나무의 유식물에 장기간 산성비를 처리하면 생장이 촉진된다(Wood와 Bormann, 1977), 그러나 뱅크스 소나무나 스트로부스 소나무에서는 침엽의 생장과 업록소 함량에 산성비가 큰 영향을 주지 않았다(Haines 등, 1980; Abouguendia와 baschak, 1987)는 보고 등 일반적으로 상반된 결과들이 알려져 있다. Gordon(1972)은 pH 4.0이하의 안개를 맞은 소나무의 침엽에 왜소 현상이 나타남을 보고 하였다. 또한 곰솔의 경우에는 pH 4.0 이하의 산성비 처리로 생장이 억제 된다는 보고(Kim과 Soh, 1994)도 있다. 또한 산성비의 처리가 진행될수록 잎의 업록소 함량과 업록색형 광지수가 감소된다는 보고와(Lee 등, 1984; Choi,

1995), 소나무 유식물의 엽록소 함량이 산성비에 의해 증가된다는 상반된 보고(정, 1987)도 있다. 본 동위효소에 대한 실험의 결과도 식물의 종에 따라 그 영향이 다르게 나타난 것으로 보아 산성비의 처리는 식물의 생장기와 종에 따라 그 감수성의 차이가 심한 것으로 판단된다.

Est는 가수분해를 촉매하고 그 구성 성분인 산과 알코올로 분해하는 효소로서 동물의 간이나 근육등에서 많이 연구되어지고 있다. POD는 과산화수소 존재에서 기질을 산화시키는 작용을 하는 효소로서 식물과 미생물에 널리 존재한다. 이 효소는 생물학적 비생물학적 스트레스에 반응해서 그 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다(Endress 등, 1980; Bowles, 1980). GDH는 NAD 또는 NADP를 수소수용체로하여 L-glutamic acid를 산화하여 2-oxyglutamic acid와 암모니아로 반응하는 효소이다. 이로 볼 때 α -Est 동위효소가 잣나무에서 강하게 나타나고 POD 동위효소가 리기다 소나무에서 감소되는 것으로 보아 산성비가 리기다 소나무의 가수분해를 촉매하고 잣나무의 기질의 산화를 감소시키는 것으로 추정할 수 있다. 금후, 산성비가 소나무속 식물의 생장, 엽록소 함량, 수분의 함량, 형태 등에 미치는 영향을 조사하고 동위효소들의 변화와 비교함으로써 산성비로 인한 영향을 더욱 분명히 밝혀야 할 필요가 있다. 또한 산성비로 인하여 없어지거나 새로이 활성화된 동위효소들을 분리하여 그 아미노산의 배열순서와 아울러 DNA 수준에서의 기작을 계속 연구하여야 할 것으로 사료된다.

적 요

산성비가 소나무, 리기다 소나무, 잣나무 잎의 동위효소 양상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pH 5.6을 대조구로 pH 3.5의 인공 산성비를 9개월간 처리하여 α -Est, POD, GDH의 변화를 조사하였다. pH 3.5의 인공산성비 처리 9개월째에 α -Est에 있어서 소나무는 동위효소의 활성에 별 변화가 없었으나, 리기다 소나무는 2개의 새로운 동위효소가 활성화되었으며, 잣나무는 2개의 새로운 동위효소가 활성화되고 5개의 동위효소는 활성이 보여지지 않았다. POD에 있어서도 소나무는 변화를 보이지 않았으나 리기다 소나무는 8개의 동위효소가 새로이 활성화되었으며,

잣나무는 4개의 동위효소의 활성이 보여지지 않았다. GDH 역시 소나무에서는 변화가 없었으나, 리기다 소나무는 2개의 새로운 동위효소가 활성화 되었고, 잣나무는 변화를 보이지 않았다.

인 용 문 헌

- Abouguendia, Z. M. and L. A. Baschak, 1987, Response of two western canadian conifers to simulated acidic precipitation, *Water Air and Soil Pollution* 33: 15-22.
- Arulsekar, S. and E. Parfitt, 1986, Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and hig. *Hortscience* 21: 928-933.
- Bassiri, A., and P.S. Carlson, 1979, Isozyme patterns in tobacco plant parts and their derived calli, *Crop Sci.* 19: 909-914
- Bassiri, A. and I. Routhent, 1977, Identification of broad bean cultivars based on isozyme patters, *Euphytica* 26:279-286.
- Berglund, D. L. and S. Eversmann, 1988, Flow cytometric measurement of pollutant stresses on algal cells, *Cytometry* 9: 150-155.
- Bingham, E. T. and K. J. Yeh, 1971, Electrophoretic patterns among alfalfa seed proteins from selected varieties, experimental stocks, and species accessions, *Crop. Sci.* 11: 58-61.
- Boscherini, G., M. Morgante, P. Rossi and G. G. Vendramin, 1994, Allozyme and chloroplast DNA variation in Italian and Greek populations of *Pinus leucodermis*, *Heredity* 73: 284-290.
- Bowles, D. J., 1990, Defence-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 873-907.
- Braekke, F. H. 1976. Impact of acid precipitation on forest and freshwater ecosystems in Norway, SNSF Project As. Norway Res. Rep. FR. 6 / 76, p. 111.
- Bringhurst, R. S., S. Arulsekar, Jr. Hancock and V. Voth, 1981, Electrophoretic characterization of strawberry cultivars, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 684-687.
- Choi, Y. B., 1995, Change in needle chlorophyll fluorescence of *pinus densiflora* and *pinus thunbergii* trated with artifical acid rain, *J. Korean For. Soc.* 84: 87-102.

- 정 용문, 1987, 인공산성우가 소나무 유묘 및 개나리 유목묘의 생장, 식물체내 함유성 성분 및 토양의 화학적 성질에 미치는 영향, 동국대 박사 학위 논문.
- Dharmawardhana D. P., B. E. Ellis and J. E. Carlson, 1995, A beta-glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin, *Plant Physiol.* 107: 331-339
- Endo, Y., 1972, Application of the nadi reaction to rice-peroxidase isozyme stain, *Bot. Mag. tokyo* 85: 147-151
- Endress, A. G., S. J. Suarez and O. C. Taylor, 1980, Peroxidase activity in plant leaves exposed to gaseous HCl or ozone, *Environmental Pollut.* 22: 47-58
- Ferenbaugh, R. W., 1976, Effects of simulated acid rain on *Phaseolus vulgaris L.* (Fabaceae), *Am. J. Bot.* 63: 283-288.
- Freeling, M. and D. Schwartz, 1973, Genetic relationships between the multiple alchol dehydrogenasas of maize, *Biochem, Genet.* 8: 27-36.
- Garty J., M. Kauppi and A. Kauppi, 1995, Differential responses of certain lichen species to sulfur-containing solutions under acidic conditions as expressed by the production of stress-ethylene, *Environ. Res.* 69: 132-143.
- Gordon, C. C., 1972, Short-long conifer needle syndrome, Interin Report to the Environmental Protection Agency, Mimeo.
- Haines, B. L., J. A. Jernstedt and H. S. Newfeld, 1985, Direct folia effects of simulated acid rain. II . Leaf surface characteristics, *New Phytol.* 99: 407-416.
- Haines, B. L., M. Stefani and F. Hendrix, 1980, Acid rain: threshold of leaf damage in eight species from a forest succession. In Effects affair pollution on mediterranean and temperate forest ecosystem P. R. Miller (ed.) USDA, Forest Service Gen. Tech. Reo. PSW-43, Berkeley, Calif. p. 235.
- Hartmann, T., M. Nagel and H. I. Ilert, 1973, Organ specific multiple forms of glutamic dehydrogenase in *Medicago sativa*, *Planta* 111: 119-128.
- Hindawi, I. J., J. A. Rea and W. L. Griffis, 1980, Response of bush bean exposed to acid mist, *Am. J. Bot.* 67: 168-172.
- Huh, G. H., S. J. Lee, Y. S. Bae, J. R. Liu and S. S. Kwak, 1997, Molecular cloning and characterization of cDNA for anionic and neutral peroxidases from suspensioncultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress, *Mol. Gen. Genet.* 255: 382-391
- Kahler A. L. and R. W. Allard, 1970, Genetics of isozyme variants in barley I . Esterase, *Crop Science* 10: 444-448.
- Karmali, A. and L. R. Santos, 1988, Purification and properties of peroxidase from *Pinus pinaster* needles, *Biochimie.* 70: 1373-1377.
- Kim, G. T., 1991, Effects of artifical acid rain on seed germination and seedling growth of several conifers. I . *J. korean For. Soc.* 80: 237-245.
- Kim S. K., S. S. Kwak, K. H. Jung, S. R. Min, I. H. Park and J. R. Liu, 1997, Selection of plant cell lines for high yield of peroxidase, *Korean Biochem. J.* 27: 132-137.
- Kim M. R. and W. Y. Soh, 1994, Growth response of *Ginkgo biloba* and *Pinus thunbergii* Exposed on simulated acid rain, *J. Plant Biol.* 37: 93-99.
- Kim M. R. and W. Y. Soh, 1995, Effect of simulated acid rain on faliar structural of changes of *Ginkgo biloba* and *Pinus thunbergii*, *J. Plant biol.* 38: 79-86.
- Kwak, S. S., D. K. Kim, K. H. Jung, S. H. Yoo, I. H. Park and J. R. Liu, 1994, Improvement of peroxidase productivity by optimization of medium composition and cell inoculum size in suspension culture of sweet potato(*Impomoea batatas*), *Korean J. Plant Tissue Culture* 21: 91-97.
- Lalonde, S., D. Morse and H. S. Saini, 1997, Expression of a wheat ADP-glucose pyrophosphorylase gene during development of normal and water-stress affected anthers, *Plant Mol. Biol.* 34: 445-453.
- Lee, J. J. and D. E. Weber, 1979, The effect of simulated acid rain on seedling emergence and growth of eleven woody species, *Forest Sci.* 25: 393-398.
- 이돈구, 김갑태, 신준환, 주광양, 1984, 인공 산성우가 소나무와 잣나무 유묘의 엽록소 함량에 미치는

- 영향, 서울대 농학연구 9: 15-19.
- Lerner, H. R., A. M. Mayer and E. Harel, 1972, Evidence for conformational changes in grape catechol and oxidase, *Phytochem.* 11: 2415-2421.
- Loukas, M., Y. Vergini and C. B. Krimbas, 1983, Isozyme variation and heterozygosity in *Pinus halepensis* L., *Biochem. Genet.* 21: 497-509.
- Mader M. and C. Walter, 1986, De-novo synthesis and release of peroxidase in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 169: 273-277.
- Mehan, M. and C. P. Malik, 1976, Studies on the physiology of pollen and pollen tube growth. I. *Pinus roxburghii*, *Acta. Histochem.* 56: 80-85.
- Maurice, C. G. and R. E. Crang, 1986, Increase in *Pinus strobus* needle transectional areas in response to acid misting, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 77-82.
- McColl, J. G. and R. Johnson, 1983, Effects of simulated acid rain on germination and early growth of Douglas-fir and Ponderosa pine, *Plant and Soil* 74: 125-129.
- Moore, G. A. and G. B. Collins, 1982, Identification of aneuploids in *Nicotiana tabacum* by isozyme banding patterns, *Biochem. Genet.* 20: 555-568.
- Morikawa, T., 1978, Identification of monosomic and nullisomic oats using leaf peroxidase isozymes, *Japan J. Genet.* 53: 191-198
- O'Farrell, P.H., 1975, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021
- Percy, K. E. and E. A. Baker, 1988, Effects of simulated acid rain on leaf wettability, rain retention and uptake of some inorganic ions, *New Phytol.* 108: 75-82.
- Powell W., M. Morgante, R. McDevitt, G. G. Vendramin and J. A. Rafalski, 1995, Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 7759-7763.
- Price, H. J. and G. L. Stebbins, 1971, The developmental genetics of the calcaroides gene in barley II. Peroxidase activity in mutant and normal plants at progressive stages of development, *Genetics* 68: 539-546.
- Raynall D. J., J. R. Roman and W. M. Eichenlaub, 1982, Response of tree seedlings to acid precipitation II. Effects of simulated acidified canopy throughfall on sugar maple seedling growth, *Environ. Exp. Bot.* 23: 385-392.
- Rubanovich, A. V. and V. A. Kal'chenko, 1994, Segregation disturbance in chronically irradiated populations of *Pinus sylvestris* L. growing in the area of the Chernobyl nuclear power plant accident, *Genetika* 30: 126-128.
- Singh N., M. Yunus, K. J. Ahmad, 1992, Performance of *Vicia faba* plants in relation to simulated acid rain and / or endsulfan treatment, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 243-248
- Stuber, C. W. and M. M. Goodman, 1981, Compilation of isozyme genotypes for 342 inbred lines, *Maize Genetics Cooperation News Letter* 55: 126.
- Takeda, S., F. Sato, K. Ida and Y. Yamada, 1990, Characterization of polypeptides that accumulate in cultured *Nicotiana tabacum* cells, *Plant Cell Physiol.* 31: 215-221.
- Wood, T. and F. H. Bormann, 1977, Short-term effects of a simulated acid rain upon the growth and nutrient relations of *Pinus strobus* L., *Water Air and Soil Pollut.* 7: 479-488.
- Yamada Y., S. Kobayashi, K. Watanabe and U. Hayashi, 1987, Production of horse radish peroxidase by plant cell culture, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 38: 31-39.
- Yang, R. C., F. C. Yeh and A. D. Yanchuk, 1996, A comparison of isozyme and quantitative genetic variation in *Pinus contorta* sp. *latifolia* by FST, *Genetics* 142: 1045-1052
- Yoon, E. S., S. R. Lee and Y. S. Lee, 1988, Estimation of genetic relationships and Characterization among *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. fil. geographical variety by the electrophoretic patterns of isozymes, *J. Oriental Bot. Res.* 1: 34-41.
- Zamir, D., S. D. Tanksley and R. A. Jones, 1981, Low temperature effect on selective fertilization by pollen mixtures of wild and cultivated tomato species, *Theor. Appl. Genet.* 59: 235-238.