Jour. Korean For. Soc. Vol. 95, No. 3, pp. 323~327 (2006)

한국임학회지

JOURNAL OF KOREAN FOREST SOCIETY

소나무 풍매차대묘의 오존 내성 및 민감성 가계간 생장, SOD 활성 및 MDA 함량 차이

이재천* · **오창영** · **한심희** · **김장수**

국립산림과학원 산림유전자원부

Difference in Growth, SOD Activity and MDA Content Between Ozone Tolerant and Sensitive Families of Open-Pollinated *Pinus densiflora*

Jae-Cheon Lee*, **Chang-Young Oh, Sim-Hee Han and Jang-Su Kim**

Department of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

요 약: 국내 주요 경제수종인 소나무의 내성 가계와 민감성 가계간의 오존에 대한 피해반응 및 내성반응을 알아보고자 본 연구를 수행하였다. 내성 가계와 민감성 가계를 각각 5가계씩 선발하여 오존 100 ppb 농도에서 90일간 처리를 하여 근원경 생장, SOD 활성, MDA 함량을 측정하였다. 근원경 생장에서 오존 처리 초기에 내성 가계가 민감성 가계에 비하여 약 3배 높은 생장율을 보였으며, 처리 기간 동안 내성 가계의 생장이 더 우수한 것으로 나타났다. 대조구에 대한 처리구의 SOD 활성비는 민감성 가계의 경우 오존 처리 초기에 증가하고 처리 기간이 길어짐에 따라서 지속적으로 감소한 반면, 내성 가계는 60일까지 증가한 후 감소하였다. 오존 처리구의 MDA 함량은 대조구에 비하여 전체적으로 높게 나타났으며, 민감성 가계가 내성 가계보다 높은 MDA 함량을 나타냈다. 따라서 내성 가계는 민감성 가계에 비하여 항산화 능력이 우수하기 때문에 지질과산화 작용을 억제하는 등 생리적 장애를 극복하는 능력이 높아 생장감소가 적게 나타나는 것으로 판단된다.

Abstract: This study was conducted to understand response of damage and tolerance to ozone between ozone tolerant and sensitive families of *P. densiflora* which had been selected by the based on visual injury and growth. Five individuals were selected in each group, and were exposed to 100ppb ozone for 90 days. Every 30 days after ozone fumigation, diamter at root collar (DRC), superoxide dismutase (SOD) activity, and malondialdehyde (MDA) content were measured. In early state of ozone fumigation tolerant families showed three times higher relative DRC growth rate than sensitive families. And during whole fumigation period growth rate of tolerant families was superior to growth rate of sensitive families. SOD activity in sensitive families was increased 30 days after fumigation, and in accordance with fumigation period extended it was decreased continuously. MDA content in ozone treatment showed higher than in control, and MDA content of tolerant families was higher than that sensitive families. In our results tolerant families has higher antioxidative activity than sensitive families. Therefore tolerant families can restrain lipid peroxidation and damage on physiological activity.

Key words : Pinus densiflora, *relative growth rate, SOD, MDA, ozone sensitivity*

서 론

질소산화물이나 황산화물 등 1차 대기오염 물질이 광화학반응에 의하여 2차 오염물질로 변하게 되는데, 이러한 오염물질 중에서 오존은 강한 독성을 가진 대기오염물질로 식물뿐만 아니라 인체에도 매우 해로운 물질이다. 오존은 식물체에 흡수되면 기공 폐쇄와 엽육세포 파괴 등을 유발하고, 광합성 감소 및 생리 · 생화학적인 저해를 통하여 수목의 생장을 감소시킨다(Pye, 1988; Pääkkönen *et al.*, 1996). 따라서 오존에 의한 가시적인 피해와 생장 변화를 이용하여 오존에 대한 종간의 감수성을 비교할 수 있다(Bergmann *et al.*, 1999; Bungener *et al.*, 1999).

오존은 기공을 통하여 식물 체내에 유입되며, 세포내에서 확산되어 여러 활성산소종을 만들어 세포 소기관을 파

*Corresponding author
E-mail: jaeclee99@foa.go.kr

괴하는 등 피해를 유발시킨다(Hippeli and Elstner, 1996; Heath and Taylor, 1997). 세포의 피해는 각종 세포 소기관을 이루는 지질막의 파괴로 나타나는데(Guidi *et al.*, 2000), 이러한 세포막의 지질과산화 반응에서 발생되는 malondialdehyde (MDA)를 오존 감수성을 판단하는 기준이 되기도 한다(Li *et al.*, 2000).

식물은 오존의 피해로부터 방어하기 위하여 기공을 폐쇄하여 오존의 유입을 막거나 유입된 오존을 생화학적으로 제거하기위한 항산화 기능을 갖고 있다(Heath, 1980). 식물체내에서 항산화 기능은 α-tocopherol, ascorbate, carotenoid, glutathione, phenolic compound 등의 항산화 물질의 작용, superoxide dismutase(SOD), peroxidase (POD) 등의 항산화 효소에 의한 작용으로 나타난다(Shannon and Mulchi, 1974). 이러한 항산화작용은 식물 종간에 뿐만 아니라 클론 간에도 차이가 나타난다(Sheng *et al.*, 1997). 따라서 항산화작용의 능력에 따라서 수종간 혹은 클론간 오존에 대하여 민감성을 판단할 수 있다. 최근 오존에 대한 수목의 반응에 관하여 많은 연구가 있었으나, 오존에 대한 생리 생화학적인 반응들이 복합적으로 나타나기 때문에 오존과의 관계를 정확하게 밝혀내는데 어려움이 있다. 따라서 오존에 대한 수목의 내성 및 민감성을 정확히 평가하기 위해서는 오존과 관련된 피해 반응 및 내성 반응의 연관성을 함께 고려하여야 한다(Bortier *et al.*, 2001).

오존에 대한 유해성 연구는 자국내의 주요 경제수종을 대상으로 집중적으로 이루어져 왔다. 국내에서는 가로수로 식재되는 여러 수종에 대하여 오존에 대한 피해 및 내성 반응에 관한 연구가 있었으며(이재천 등, 2005b), 경제수종으로 자작나무류에 대하여 연구가 수행되었다(한심희 등, 2002; 이재천 등, 2004). 최근에는 생물 공학적으로 오존의 내성을 증진시키기 위하여 현사시나무를 형질전환 시킨 후 이를 대상으로 한 오존처리 후 나타나는 내성에 관한 연구가 이루어지고 있다. 본 연구는 국내 주요 경제수종인 소나무를 대상으로 가시적 피해 및 생장을 기초로 1차적으로 선발한 내성 가계와 민감성 가계를 이용하여 오존에 의한 피해반응을 조사하고 내성 능력의 차이를 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구에 사용한 재료는 국립산림과학원 산림종자연구소 안면도 채종원에서 채취한 풍매 종자를 발아시킨 3년생 묘목을 사용하였다. 가시적 피해, 근원경 생장 및 건중량을 이용하여 선발한 내성 가계와 민감성 가계를 대상으로 오존 처리를 하였다(이재천 등, 2005a). 오존 처리 대상 가계는 내성 가계로 선발된 강원(Kw) 4, 9, 16, 73, 경북(Gb) 38호와 민감성 가계로 선발된 강원(Kw) 10, 17, 충북(Cb) 1, 경북(Gb) 3, 18호를 이용하였다.

2. 오존처리

각 가계별로 10개체를 선발하여 대조구(무처리)와 처리구(100 ppb/hr)로 구분하여 각각 5개체씩 인공광 챔버로 옮겨 오존 처리를 하였다. 오존 처리는 오전 9시부터 오후 5시까지 하루 8시간씩 2004년 5월 20일부터 90일간 하였으며, 국립산림과학원 산림유전자원부의 환경제어실내 오존처리 시설을 이용하여 수행하였다(이재천 등, 2001). 챔버는 walk-in type으로 16.2 m^3(3 m×3 m×1.8 m)인 인공광형실로 처리기간 중 450 μmol/m^2/s 의 광조건과 온도 25±1°C, 습도 70±5%를 유지하였다. 실험기간 동안의 대조구와 처리구 챔버내의 평균 오존 농도는 각각 5±1 ppb, 98±5 ppb로 기록 되었다.

3. 오존 감수성 평가

1) 근원경 생장

오존 처리 후 30일 간격으로 근원경을 측정하고, $[Ln(x_2)-Ln(x_1)]/(t_2-t_1)$의 식에 의해 상대생장율(relative growth rate)을 계산하였다(Beadle, 1993). 여기서 *x1*와 *x2*는 각 기간의 초기(t_1)와 후기(t_2)의 근원경을 나타낸다.

2) SOD 활성

잎의 superoxide dismutase (SOD) 활성은 nitro blue tetrazolium (NBT) 환원법을 이용하였으며, 분광광도계로 530 nm에서 120초 동안의 흡광도 증가를 측정하였다(Beauchamp and Fridovich, 1971). 활성은 Asada *et al.*(1974)의 V/v-1의 식에 의해서 계산하였으며, V와 v는 각각 SOD가 없을 때와 존재할 때, NBT의 환원 속도를 나타낸다.

3) MDA 함량

잎의 malondialdehyde (MDA) 함량 측정은 45°C에서 N-methyl-2-phenylindole (NMPI)과 MDA와의 반응을 기초로 한 방법에 의해 수행하였으며, 분광광도계를 이용하여 586 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다(Esterbauer와 Cheeseman 1990).

결과 및 고찰

1. 생장

오존 처리 기간동안 내성 가계가 민감성 가계에 비하여 근원경 생장이 우수한 것으로 나타났다(Figure 1). 오존 처리 30일 이후 내성 가계의 초기 생장은 평균 0.063으로 나타났으며, 민감성 가계는 평균 0.021로 나타나 초기의 생장에서 약 3배 높게 나타났으며, 시간이 지남에 따라서 감

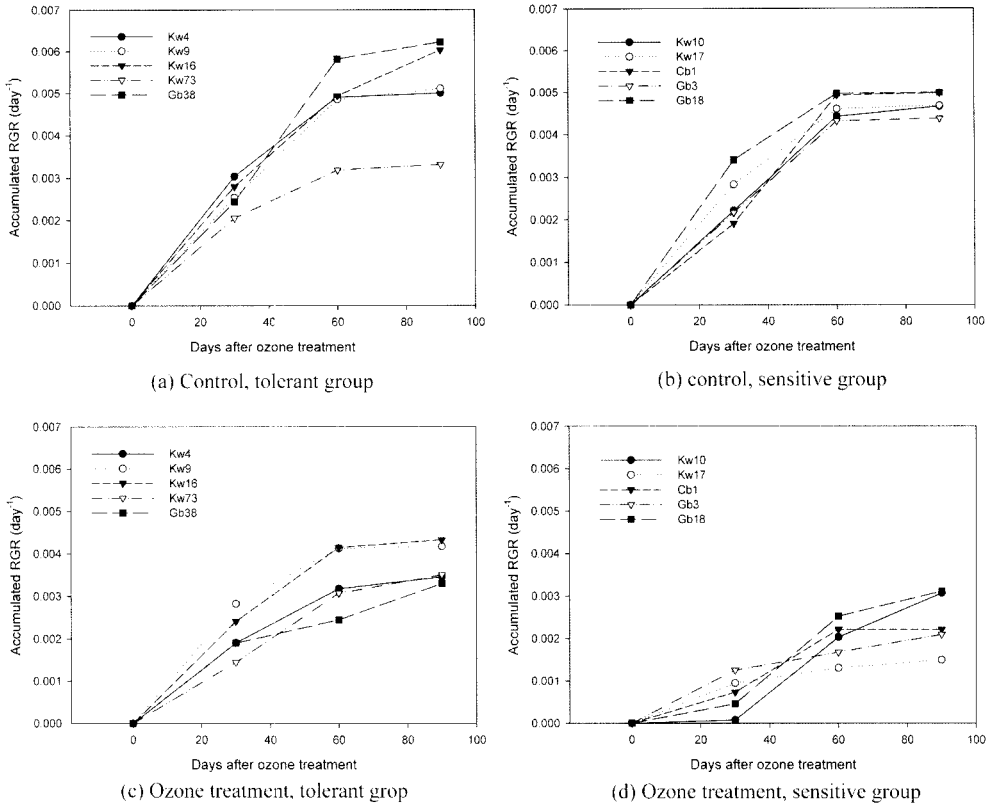


Figure 1. Accumulated relative growth rate (RGR) for diameter at root collar (DRC) of 3-year old *P. densiflora* seedlings. Each data point represents mean of five replicates.

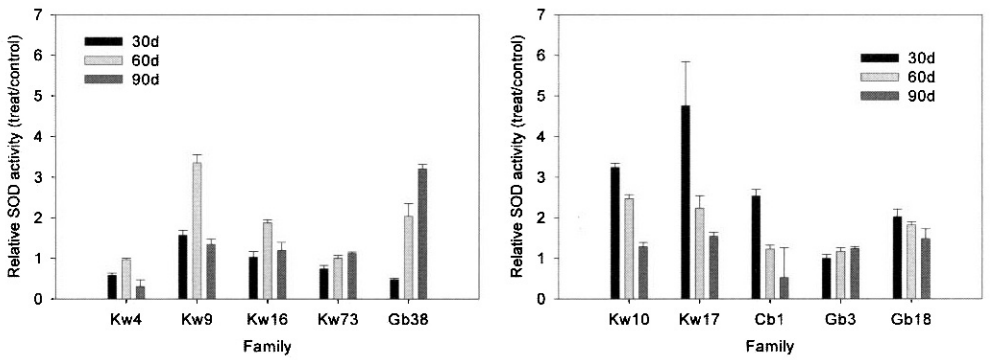


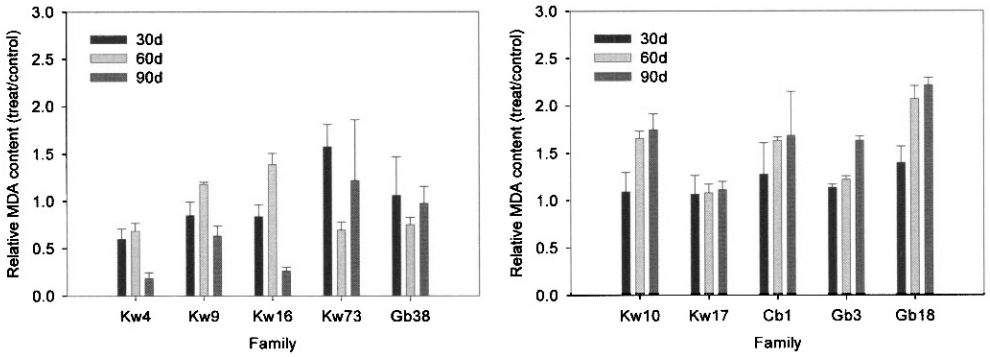
Figure 2. Relative SOD activity of tolerant group (left) and sensitive group (right) of *P. densiflora* exposed to 100 ppb ozone for three months. Each data point represents mean ± standard deviation of five replicates. Relative ratio was calculated by treatment divided by control.

소하여 90일 후에는 내성 가계가 약 1.6배 높은 것으로 나타났다. 내성 가계 중에서 오존 처리 초기 생장이 가장 우수한 가계는 강원 9호로 나타났으며, 강원 10호는 민감성 가계 중 가장 낮은 생장율을 보였다. 민감성 가계는 오존 처리기간 동안 가계간에 생장율 변화가 나타나 강원 10호의 경우 처리 기간이 늘어남에 따라서 생장율 증가가 나타난 반면, 초기에 상대적으로 높은 생장율을 보인 강원 17호와 경북 3호는 60일 이후로 감소하는 것으로 나타났다.

본 연구에서 나타난 결과는 이재천 등(2005a)의 가시적인 피해와 생장을 기준으로 판단한 오존 감수성과 같은 결과로 나타났다. 오존 스트레스에 대하여 *Prunus serotina* 클론 중 오존 민감성 클론과 내성 클론을 대상으로 연구한 결과, 클론 간에 잎의 형태적 차이가 나타나며, 오존 스트레스에 대하여 생리적 활성이 다르다는 연구 결과가 보고되었다(Steiner and Davis, 1979; Ferdinand *et al.*, 2000). 따라서 선발된 오존 내성 가계와 민감성 가계의 오존 감수성은 가계간 유전형질이 다르기 때문에 서로 다른 양상의 생장율을 보인 것으로 판단된다.

2. SOD 활성

대조구에 대한 처리구의 SOD 활성 비율은 오존 감수성 그룹 간에 뿐만 아니라 가계 간에도 서로 다른 양상으로



Fiure 3. Relative MDA content of tolerant group (left) and sensitive group (right) of *P. densiflora* exposed to 100 ppb ozone for three months. Each data point represents mean ±standard deviation of five replicates. Relative ratio was calculated by treatment divided by control.

나타났다(Figure 2). 하지만 SOD 활성비의 변화 양상은 민감성 가계와 내성가계 간에 두드러진 차이가 나타났다. 민감성 가계에서 오존 처리 초기 즉 30일 이후 측정한 SOD 활성비는 민감성 가계가 내성 가계에 비하여 상대적으로 높게 나타났으며, 오존 처리 시간이 길어짐에 따라서 전체적으로 감소하였다. 하지만 내성 가계의 활성은 오존 처리 60일까지 증가한 후 감소하였으며, 경북 38호는 오존 처리 기간 동안 지속적으로 증가한 것으로 나타났다.

일반적으로 다양한 스트레스 하에서 내성 수종들의 SOD 활성은 증가하지만(Sheng *et al.*, 1997), 스트레스가 장기간 지속되거나 과다한 스트레스가 가해지면 SOD 활성은 감소하게 된다(Bennet *et al.*, 1984). 그리고 오존에 대한 종간 내성 차이에 의해서 수종간에 항산화효소의 반응이 다르게 나타나며, 오존에 노출된 시간에 따라서 SOD 활성의 변화가 다르게 나타난다(Sheng *et al.*, 1997; 이재천 등, 2005b). 오존에 대한 SOD 활성은 내성 수종에서 증가하고, 민감성 수종에서 감소하지만 SOD의 과다 발현은 가시적 피해로 나타나기 때문에, 결국 생장에 필요한 에너지가 손실되어 생장 감소와 고사에 이르게 한다(Sheng *et al.*, 1997).

본 연구에서 나타난 결과는 민감성 가계의 경우 처리 초기에 오존에 대하여 민감하게 반응하여 SOD의 활성이 촉진되었지만 내성 능력 저하로 인하여 시간이 지남에 따라서 활성이 지속적으로 감소하였다. 하지만 내성 가계는 상대적으로 초기에 민감하게 반응하지 않고 시간이 지남에 따라서 증가된 후 감소하였다. 따라서 오존 내성 능력에 의해 SOD 활성 변화 양상이 가계 간에 다르게 나타나(Karnosky *et al.*, 1998), 선발된 내성 가계의 항산화 기능이 민감성 가계에 비하여 우수한 것으로 판단된다.

3. MDA 함량

내성 가계와 민감성 가계의 MDA 함량 비율은 초기에는 비슷한 수준으로 나타났으나, 오존 처리 기간이 증가함에 따라서 민감성 가계에서 처리구의 MDA 함량이 상대적으로 증가한 것으로 나타났다(Figure 3). 민감성 가계 중 강원 10호와 경북 18호는 오존 처리 60일후 측정한 처리구의 MDA 함량이 30일후 측정한 함량에 비하여 약 50% 증가한 것으로 나타났다. 반면에 내성 가계는 처리 기간 동안 민감성 가계에 비하여 상대적으로 적은 MDA 함량 변화가 나타났다. 민감성 가계 중 경북 3호와 경북 18호는 SOD 활성에서 매우 낮게 나타나 내성 능력이 저조한 것으로 판단되었는데, MDA 함량비에서 오존 처리 90일 이후 처리 초기에 비하여 경북 3호의 경우 40% 이상 증가하였으며, 경북 18호는 약 60% 증가한 것으로 나타났다.

오존에 의해 생성된 활성산소 중 singlet oxygen (O-)는 세포막의 불포화지방산과 반응하여 과산화수소를 만들며 세포막의 지질과산화를 유발시킨다(Knox and Dodge, 1985; Hippeli and Elstner, 1996). 또한 활성산소는 광합성의 전자전달계에도 직접적으로 영향을 미쳐서 광합성 저해를 유발하는 등 식물의 생리적 기능에 장애를 준다(Guidi *et al.*, 2000; Jiri *et al.*, 2003).

본 연구 결과에서 내성 가계와 민감성 가계 모두 대조구에 비하여 처리구에서 높은 MDA 함량이 나타나 오존에 의한 지질과산화가 촉진되었다. 또한 민감성 가계는 오존에 대한 저항력이 낮아 내성 가계에 비하여 높은 MDA 함량을 나타낸 것으로 판단된다. 따라서 장기간 동안 오존 스트레스를 받을 경우 내성 가계는 항산화 능력의 빠른 저하와 지질과산화 작용에 의한 세포 파괴 등으로 생장 감소는 더욱 크게 나타날 것으로 판단된다.

인용문헌

1. 이재천, 김장수, 한심희, 김판기. 2004. 오존에 노출된 자작나무류의 기공개폐와 광합성 반응. 한국농림기상학회 6: 11-17.

2. 이재천, 오창영, 한심희, 김장수. 2005a. 소나무 풍매차대묘의 가계간 오존에 대한 민감성 반응. 한국임학회지 94: 191-196.
3. 이재천, 오창영, 한심희, 김판기. 2005b. 오존 노출시간에 따른 버즘나무와 백합나무의 광합성과 SOD 활성 변화. 한국농림기상학회지 7: 156-163.
4. 이재천, 김인식, 여진기, 구영본. 2001. 잎의 가시적 피해에 따른 오존에 대한 미루나무(*Populus deltoides*) 클론간 감수성 비교. 한국임학회지 90: 10-18.
5. 한심희, 이재천, 장석성, 홍용표. 2002. 탄수화물 배분과 분할 패턴을 기초로 한 자작나무류 4수종의 오존 민감성 비교. 한국임학회지 91: 449-456.
6. Asada, K., M. Takahashi and M. Nagate. 1974. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. Agricultural and Biological Chemistry 38: 471-473.
7. Beadle, C.L. 1993. Growth analysis. pp. 36-46. In : D.O. Hall, J.M.O. Scurlock. H.R. Bolhar-Nordenkampf, R.C. Leegood, and S.P. Long, ed. Photosynthesis and Production in a Changing Environment, A Filed and Laboratory Manual. Chapman & Hall. London.
8. Beauchamp, C. and I. Fridovichi. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.
9. Bennet, J.H., E.H. Lee and H.E. Heggestad. 1984. Biochemical aspect of plant. pp. 413-424. In : Koziol, M.J. and F.R. Whatley, ed. Gaseous Air Pollutants and Plant Metabolism. Butterworth. England.
10. Bergmann, E., J. Bender, and H.J. Weigel. 1999. Ozone threshold doses and exposure-response relationships for the development of ozone injury symptoms in wild plant species. New Phytologist 144: 423-435.
11. Bortier, J., K. Vandermerien, L. De Temmerman and R. Ceulemans. 2001. Growth, photosynthesis and ozone uptake of young beech (*Fagus sylvatica* L.) in response to different ozone exposures. Trees 15: 75-82.
12. Bungener, P., G.R. Balls, S. Nussbaum, M. Giessman, A. Grub and J. Furher. 1999. Leaf injury characteristics of grassland species exposed to ozone in relation to soil moisture condition and vapour pressure deficit. New Phytologist 142: 271-282.
13. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology 186: 407-421.
14. Ferdinand, J.A., T.S. Fredericksen, K.B. Kouteric and J.M. Skelly. 2000. Leaf morphology and ozone sensitivity of two open pollinated genotypes of black cherry (*Prunus serotina*) seedlings. Environmental Pollution 108: 297-302.
15. Guidi, L., M. Tonini, and G.F. Soldatini. 2000. Effects of high light and ozone fumigation on photosynthesis in *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry 38: 717-725.
16. Heath, R.L. 1980. Initial events in injury to plants by air pollutants. Annual Review of Plants Physiology 31: 395-431.
17. Heath, R.L. and G.E. Taylor. 1997. Physiological processes and plant responses to ozone exposure. pp. 317-368. In : Sandermann, H., A.L. Wellburn and R.L. Heath, ed. Forest Decline and Ozone, Ecological Studies. Springer-Verlag.
18. Hippeli, S. and E. Elstner. 1996. Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants. Journal of Plant Physiology 148: 249-257.
19. Jiri, S., M. Gilbert, I. Weingart and C. Wilhelm. 2003. Thermoluminescence as a tool for monitoring ozone-stressed plants. Environmental Pollution 123: 15-20.
20. Karnosky, D.F., G.K. Podila, Z. Gagnon, P. Pechter, A. Akkapeddi, Y. Sheng, D.E. Riemenschneider, M.D. Coleman, R.E. Dickson and J.G. Isebrands. 1998. Genetic control of responses to interacting tropospheric ozone and CO_2 in *Populus tremuloides*. Chemosphere 36: 807-812.
21. Knox, J.P. and A.D. Dodge. 1985. Singlet oxygen and plants. Phytochemistry 24: 889-896.
22. Li, Y., Y. Zu, J. Chen, H. Chen, J. Yang and Z. Hu. 2000. Intraspecific differences in physiological response of 20 wheat cultivars to enhanced ultraviolet-B radiation under field conditions. Environmental and Experimental Botany 44: 95-103.
23. Pääkkönen, E., J. Vahala, T. Holopainen, R. Karjalainen and L. Karenlampi. 1996. Growth responses and related biochemical and ultrastructural changes of the photosynthetic apparatus in birch (*Betula pendula*) saplings exposed to low concentrations of ozone. Tree Physiology 16: 597-605.
24. Pye, J.M. 1988. Impact of ozone on the growth and yield of trees: a review. Journal of Environmental Quality 17: 347-360.
25. Shannon, J.G. and C.L. Mulchi. 1974. Ozone damage to wheat varieties at anthesis. Crop Science 14: 335-337.
26. Sheng, Y., G.K. Podila and D.F. Karnosky. 1997. Differences in O_3-induced superoxide dismutase and glutathione antioxidant expression in O_3 tolerant and sensitive trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones. Forest Genetics 4: 25-33.
27. Steiner, K.C. and D.D. Davis. 1979. Variation among *Fraxinus* families in foliar response to ozone. Canadian Journal of Forest Research 9: 106-109.

(2006년 2월 27일 접수; 2006년 3월 20일 채택)