

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

김정배, 조현제, 김학운*

대구광역시 달서구 신당동 1000번지 계명대학교 환경대학

Effects of Soil pH on the Growth and Antioxidant System in French Marigold (*Tagetes patula* L.)

Jeung Bea Kim, Hyun Je Cho and Hak Yoon Kim*

College of Environment, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract - To investigate the effects of soil pH on plants, the seedlings of french marigold (*Tagetes patula* L.) was transplanted into the soils acidified with H₂SO₄ solutions (pH 5.3, 4.5, 3.9, 3.5). The level of malondialdehyde was significantly increased by soil acidification. As the pH levels decreased from 5.3 to 3.5, the contents of dehydroascorbate and oxidized glutathione of the plant were significantly increased. The antioxidative enzyme activities of the plant affected by soil acidification were increased as the pH decreased.

Key words - Antioxidant system, French marigold, Malondialdehyde, Soil acidification

서 언

산성비는 직접적으로 식물에 악영향을 미칠 뿐만 아니라 토양 산성화를 통해 간접적으로 식물에 악영향을 미친다(김, 2005). 우리나라의 토양 산성화 정도는 농경지에 비하여 비농경지나 숲에서 더 심각하다. 전국 주요 지역의 숲을 대상으로 토양 산성화를 조사한 결과 평균 pH 5.0이었으며, 특히 서울 인왕산 지역은 pH 4.0으로 나타났다(한국산지보전협회, 2006). 이와 같이 전국적 현상인 토양 산성화는 수목뿐만 아니라 우리나라 전국에 자생하는 식물들에게 상당한 스트레스로 작용하여 피해를 나타낼 것으로 사료된다.

식물은 저온, 건조 등의 환경 스트레스에 의해 체내에 활성산소가 생성되고, 그로 인해 산화 스트레스가 일어나는 것으로 보고되고 있다(김과 김, 2005). 그러나 식물은 활성산소를 효과적으로 해독하기 위한 생화학적 방어기구를 가지고 있는데 superoxide dismutase(SOD), ascorbate peroxidase(AP) 등의 항산화 효소와 ascorbic acid, glutathione 등의 저분자 항산화 물질들이 관여되어 있는 것으로 알려져 있다(Elstner, 1982). 따라서 식물의 생화학적 방어능력의 차이에 의해 환경 스트레스에 대한 피해 정도가 다르게 나타나는 것으로 추측된다.

토양 산성화가 식물에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 그러나 이들 연구의 대부분은 경제적 가치가 있는 수목이나 주요 농작물의 성장반응과 피해 메커니즘에 대한 연구가 대부분이며(이 등, 2005; Fan and Wang, 2000), 초본류의 자생식물에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 일반적으로 목본식물보다 초본식물이 산성비에 대한 감수성이 높은 것으로 알려져 있고(Haines *et al.*, 1980), 일년생 초본식물은 발아에서부터 토양 산성화의 직접적인 영향을 받을 가능성이 있기 때문에 초본식물에 대한 토양 산성화의 연구가 절실히 요구되고 있다.

본 연구는 전국적으로 도시의 화단 및 꽃길 조성용으로 많이 이용되고 있으며, 산성비에 감수성을 보이는 것으로 보고된(김과 김, 2005) 초본식물인 만수국을 대상으로 날로 심각해져 가는 토양 산성화에 의한 식물피해 양상을 조사하고, 토양 산성화가 활성산소 생성에 의한 산화 스트레스를 일으키는지를 조사함과 동시에 토양 산성화에 대한 식물의 생화학적 방어반응을 조사하고자 수행하였다.

재료 및 방법

토양 pH 조절

대구수목원 인근 비농경지 토양을 대상으로 유기물 층을 제

*교신저자(E-mail) : hykim@kmu.ac.kr

거한 후, 0~10cm 깊이에서 채취한 토양을 표준체(aperture: 2mm)로 석력 및 식물 뿌리를 제거하고, 실내에서 2주간 음건시킨 후 공시토양으로 사용하였다.

황 성분에 의한 토양 산성화가 초본식물에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이 등(2005)의 방법에 따라 공시토양 1,000ml에 0.0, 0.4, 0.8, 1.2N의 황산용액 100ml를 첨가하고 혼합하여 산성 토양을 만들었다. 이때 각 처리구의 토양 1,000ml에 첨가된 H⁺의 양은 각각 0, 40, 80, 120meq이었다.

식물 재배

2% sodium hypochloride 용액으로 만수국(*Tagetes patula* L.)의 종자표면을 살균하여 발아시킨 후, 500g의 배양상토를 넣은 플라스틱 포트에 1개체씩 파종하여 인공기상실에서 3주간 재배하였다. 인공기상실 내의 온도는 낮(7시~19시)이 30℃, 밤(19시~7시)이 20℃이었으며, 습도는 주야간 공히 70 ± 5%를 유지하였다. 3주 동안 생육한 만수국의 건전한 식물체를 선발하여, 1,000ml의 황산용액을 처리한 산성 토양이 담긴 플라스틱 포트에 1개체씩 이식하여, 3주간 인공기상실내에서 재배하였다. 생육기간 중 하루에 한번 일정량의 증류수를 관수하였다. 토양 산성화에 의한 만수국의 성장반응을 조사하기 위하여 3주 동안 생육한 건전한 식물체를 선발하여 초장 및 건물중을 조사하였다.

토양 pH 측정

토양 pH 측정은 김 등(1999)의 방법에 따라 음건토양과 증류수를 1:5로 혼합하여 30분간 진탕한 후, 여과지(Whatman NO. 44)로 여과시켜, pH 측정기(Fisher 230 A)로 측정하였다.

Malondialdehyde(MDA) 및 total carotenoid 함량 측정

MDA 함량은 Heath와 Packer(1968)의 방법에 따라 30cm²의 잎을 채취하여 6ml의 증류수를 넣어 마쇄하고, 20% trichloroacetic acid와 0.5% thiobarbituric acid로 반응시킨 후, 532nm와 600nm에서의 흡광도를 조사하여 그 함량을 측정하였다. Total carotenoid 함량은 Lichtenthaler(1987)의 등식에 의해 분광광도계를 이용하여 470nm, 648nm 및 664nm에서의 흡광도를 측정하여 함량을 조사하였다.

Ascorbic acid 및 glutathione 함량 측정

Ascorbic acid 함량 변화를 조사하기 위하여 3주간의 산성 토양에 생육시킨 만수국 잎 30cm²를 채취하여 10ml의 methaphosphoric acid 용액으로 반응시킨 후 Bolin과 Book(1974)의 방법에 의해 환원형인 ascorbic acid(AsA)와 산화형인 dehydroascorbate(DHA)의 함량을 측정하였다. Glutathione 함량은

Law 등(1983)의 방법에 따라 환원형 glutathione(GSH) 및 산화형 glutathione(GSSG)의 함량을 측정하였다.

항산화 효소의 활성 측정

3주간 산성 토양에 생육시킨 만수국 잎 30cm²를 채취하여 potassium phosphate buffer(pH 7.8)로 추출하여 활성분석에 사용하였다. SOD의 활성은 Schoner과 Krause(1990)의 방법에 따라 cytochrome c의 감소를 A₅₅₀에서 측정하였으며, AP의 활성은 A₂₉₀(2.8mM⁻¹cm⁻¹)에서 H₂O₂에 의한 ascorbic acid의 산화를 조사하였다(Tanaka *et al.*, 1982). Monodehydroascorbate reductase(MDHAR)의 활성은 A₃₄₀(6.2mM⁻¹cm⁻¹)에서 NADH의 산화를 조사하였으며, dehydroascorbate reductase(DHAR)의 활성은 A₂₉₀(2.8mM⁻¹cm⁻¹)에서 dehydroascorbate에서 ascorbate로의 환원을 조사하는 Tanaka 등(1982)의 방법에 따라 측정하였다. Glutathione reductase(GR)의 활성은 A₃₄₀(26.6mM⁻¹cm⁻¹)에서 NADPH의 감소량을 측정하였으며(Schoner and Krause, 1990), guaiacol peroxidase(GP)의 활성은 H₂O₂ 존재 하에서의 guaiacol의 산화를 A₄₇₀(26.6mM⁻¹cm⁻¹)에서 측정하였다(Tanaka and Sugahara, 1980).

결과 및 고찰

토양 pH

황산용액 첨가에 의한 토양 pH 변화를 Table 1에 나타내었다. 무처리 토양은 pH 5.3이었으며, 황산용액의 첨가량이 40meqH⁺, 80meqH⁺, 120meqH⁺으로 증가 할수록 토양 pH는 낮아져 각각 pH 4.5, pH 3.9, pH 3.5로 나타났다.

Table 1. Changes of soil pH after soil acidification with H₂SO₄ solution

| H ₂ SO ₄ treatment | Soil pH |
|--|-----------|
| 0 meqH ⁺ | 5.3 ± 0.3 |
| 40 meqH ⁺ | 4.5 ± 0.2 |
| 80 meqH ⁺ | 3.9 ± 0.1 |
| 120 meqH ⁺ | 3.5 ± 0.2 |

식물 생육

토양의 H⁺ 부하량 증가가 만수국 생육에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 초장의 경우 pH 4.5 처리에서는 큰 변화가 나타나지 않았으나, pH 3.9 및 pH 3.5 처리에서 대조구인 pH 5.3 처리에 비해 각각 13% 및 29%의 초장 감소를 나타내었다. 건물중도 pH 4.5의 산성 토양 처리에 의하여 큰 변화는 나타나지 않았으나, pH 3.9 및 pH 3.5 처리에서 대조구인 pH 5.3 처리에 비하여 각각 18% 및 41%의 건물중 감소를 나타내었다. 이

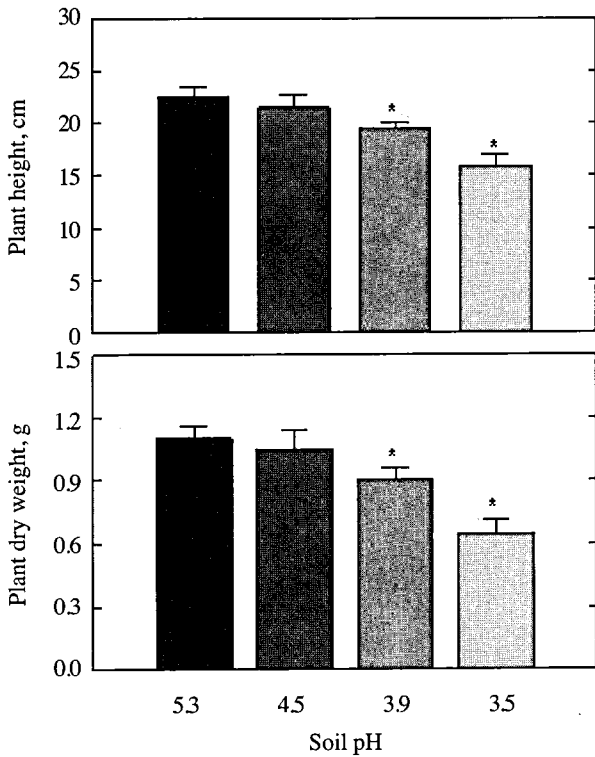


Fig. 1. Effects of soil acidification on plant height and dry weight of french marigold. Each value is mean \pm SE of 10 plants. Asterisk (*) represents significant difference at $p < 0.05$.

결과로 볼 때 만수국은 토양의 H^+ 부하량 증가에 따른 직접적인 생육억제의 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 현재까지 토양 산성화 과정과 식물 피해에 관하여 많은 연구가 수행되어져 왔으며, 크게 양이온 결핍설과 Al 독성설이 유력하게 이해되어지고 있다(장과 이, 1995). 최근에 유럽을 중심으로 산성 물질 한계 부하량을 평가하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 수목 성장량과 토양중의(Ca+Mg+K)/Al 몰농도비가 밀접한 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다(Sverdrup *et al.*, 1994).

MDA 및 Total carotenoid 함량 변화

토양 산성화에 따른 만수국 잎의 MDA(지질과산화물) 함량 변화를 조사한 결과, 토양 pH가 낮아질수록 MDA 함량이 증가되는 것으로 나타났으며, pH 3.9 및 pH 3.5 처리에서 무처리인 pH 5.3에 비하여 각각 54% 및 60%의 MDA 함량 증가를 나타내었다(Fig. 2). 식물은 여러 종류의 환경 스트레스에 노출되었을 때 활성산소 생성에 의한 산화 스트레스를 받으며, 생체 막지질은 산화 스트레스에 민감하게 반응하는 부분으로 알려져 있다(Heath and Packer, 1968). 본 실험에서 MDA 함량 증가는 생체 막지질이 토양 산성화의 잠재적인 표적임을 시사하며, 토양의 H^+ 부하량 증가가 만수국 잎에 산화 스트레스를 일으키며 그

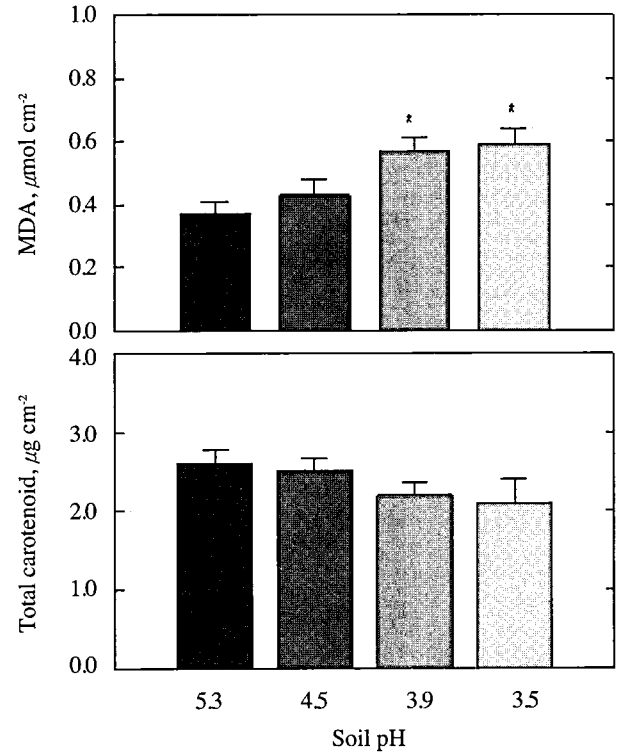


Fig. 2. Effects of soil acidification on contents of MDA and carotenoid of french marigold. Each value is mean \pm SE of 6 plants. Asterisk (*) represents significant difference at $p < 0.05$.

로 인해 막지질의 조성이 크게 변화된 것으로 사료된다.

Carotenoid는 산화작용으로부터 막지질을 보호하는 항산화 물질로 알려져 있다(Foyer *et al.*, 1994). 그러나 본 실험에서는 토양 pH 변화에 따른 만수국 잎의 total carotenoid 함량 변화는 나타나지 않았다(Fig. 2).

Ascorbic acid 및 Glutathione 함량 변화

본 실험에서 토양의 H^+ 부하량 증가에 따라 환원형인 AsA 함량이 감소하고 DHA 및 total ascorbic acid(AsA+DHA) 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Table 2). 또한 산화 스트레스에 의한 피해 정도를 나타내는 DHA/AsA의 비율이 pH 3.9 및 pH 3.5 처리에서 무처리인 pH 5.3에 비해 각각 2.0배 및 2.2배로 증가되는 것으로 나타났다(Table 2). 이와 같은 산화형의 증가 경향은 glutathione 함량에서도 나타났다. 토양의 H^+ 부하량 증가에 따라 환원형인 GSH의 함량이 감소하고 산화형인 GSSG의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 산화 스트레스에 의한 피해 정도를 나타내는 GSSG/GSH의 비율이 pH 3.9 및 pH 3.5 처리에서 무처리인 pH 5.3에 비해 각각 2.1배, 2.3배로 증가되는 것으로 나타났다(Table 2). 이와 같은 산화형/환원형의 비율 증가는 O_3 및 UV-B 등의 스트레스 실험에서도 보고

Table 2. Effects of soil acidification on contents of ascorbic acid and glutathione in leaves of french marigold

| Soil pH | Ascorbic acid ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | | | Glutathione ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | | |
|---------|---|----------|---------|---------------------------------------|----------|----------|
| | AsA+DHA | AsA | DHA/AsA | GSH+GSSG | GSH | GSSG/GSH |
| 5.3 | 11.6±0.8 | 5.9±0.4 | 1.03 | 9.9±0.6 | 5.1±0.3 | 0.94 |
| 4.5 | 11.8±0.7 | 5.3±0.5 | 1.23 | 11.7±0.7 | 5.3±0.5 | 1.21 |
| 3.9 | 14.6±1.1* | 4.7±0.3* | 2.11* | 12.9±1.0* | 4.3±0.3* | 2.00* |
| 3.5 | 14.7±1.7* | 4.5±0.5* | 2.27* | 13.1±0.6* | 4.1±0.4* | 2.20* |

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.

되어 있으며(Elstner 1982; Kim *et al.*, 1996), 토양 산성화에 의해 만수국 잎에 활성산소가 생성되고 그로 인해 산화 스트레스가 일어남을 시사한다.

항산화 효소의 활성 변화

토양 산성화에 따른 만수국 잎의 SOD의 활성은 토양의 H^+ 부하량이 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났으며 pH 3.9 및 pH 3.5 처리에서 공히 무처리에 비하여 약 80%의 활성 증가를 나타내었다(Fig. 3). 이는 토양 산성화에 의해 식물 체내에 superoxide가 생성되고 이를 무독화 시키기 위해 SOD의 활성이 증가한 것으로 사료된다. AP의 활성도 토양의 H^+ 부하량의 증가에 따라 크게 증가하는 것으로 나타나,

SOD에 의해 생성된 H_2O_2 의 무독화를 위하여 AP의 활성이 증가된 것으로 사료된다. MDHAR과 GR의 활성은 pH 3.9 처리부터 크게 증가하는 경향을 보인 반면, GP의 활성은 pH 4.5의 처리부터 크게 증가하는 것으로 나타났다. 전체적으로 볼 때 H^+ 부하량 증가에 따라 토양 산성화가 진행될수록 항산화 효소의 활성도 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 항산화 효소의 활성 증가는 대기오염 물질이나 여러 가지환경 스트레스에 의해서도 보고되어 있으며(Kim *et al.*, 1996; Schonher and Krause, 1990; Tanaka and Sugahara, 1980), 토양 산성화에 의해 만수국 식물에 활성산소가 생성되고 이를 무독화하기 위해 식물의 생화학적 방어 기작이 작용한 것으로 사료된다.

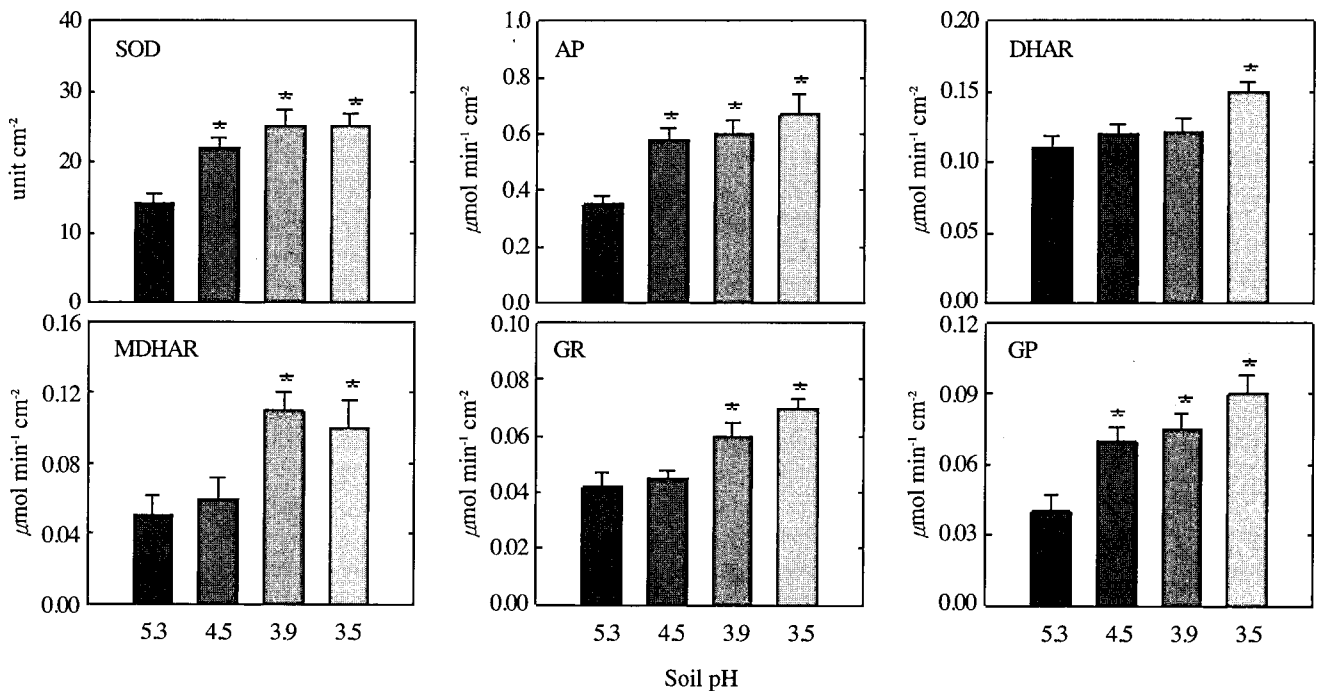


Fig. 3. Effects of soil acidification on activities of ascorbate peroxidase (AP), dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) and guaiacol peroxidase (GP) in leaves of french marigold. Each value is the mean of 6 plants.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

적 요

인위적인 토양 pH 변화가 식물에 미치는 영향과 식물의 생화학적 방어반응을 조사하고자 황산용액을 첨가하여 산성화시킨 토양(pH 5.3, 4.5, 3.9, 3.5)에 만수국을 이용하여 실험을 수행하였다. 토양 산성화에 의해 MDA 함량이 크게 증가되었다. 토양의 H⁺ 부하량 증가에 따라 산화형인 DHA 및 GSSG의 함량이 크게 증가되었다. 항산화 효소의 활성도 토양의 H⁺ 부하량의 증가에 따라 증가하는 것으로 나타났다.

인용문헌

Bolin, D.W. and L. Book. 1974. Oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic acid. *Science* 106: 451.

Elstner, E.F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 73-96.

Fan, H.B. and Y.H. Wang. 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.

Foyer, C.H., P. Descourvieres and K.J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507-523.

Haines, B., M. Stefani and F. Hendrix. 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.

Heath, R.L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198.

Kim, H.Y., K. Kobayashi, I. Nouchi and T. Yoneyana. 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.

Law, N.Y., S.A. Charles and B. Halliwell. 1983. Glutathione and

ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and paraquat. *Biochem. J.* 210: 899-903.

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthesis. *Methods Enzymol.* 148: 305-352.

Schoner, S. and G.H. Krause. 1990. Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold accumulation in excess light. *Planta* 180: 383-389.

Sverdrup, H., P. Warfringe and B. Nihlgard. 1994. Assessment of soil acidification on forest growth in Sweden. *Water, Air and Soil Pollut.* 78: 1-36.

Tanaka, K. and K. Sugahara. 1980. Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation. *Plant Cell Physiol.* 21: 601-611.

Tanaka, K., N. Kondo and K. Sugahara. 1982. Accumulation of hydrogen peroxide in chloroplasts of SO₂ fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 23: 999-1007.

김준호, 임병선, 김종욱. 1999. 수도권 일대 신갈나무 숲의 토양 이온, 식물체 영양염류 함량 및 생장의 비교. *한국생태학회지* 22(1): 13-19.

김준호. 2005. 대기산성강하물: 한국과 세계의 산성비 실태. *한국생태학회지* 28(3): 169-180.

김학운, 김정배. 2005. 인공산성비가 만수국 (*Tagetes patula* L.)의 생육 및 항산화 작용에 미치는 영향. *한국환경농학회지* 24(2): 159-163.

이충화, 이승우, 김은영, 김영걸, 변재경, 원형규, 진현오. 2005. 인위적인 토양 산성화가 소나무 묘목의 생장에 미치는 영향. *한국생태학회지* 28(6): 389-393.

장관순, 이수욱. 1995. 산성우에 대한 산림생태계의 민감도 및 자정기능 (Ⅱ)식생층과 토양층 용탈이온 분석을 중심으로. *한국임학회지* 84(1): 103-113.

한국산지보전협회. 2006. 전국 산림 건강 모니터링 조사 종합보고서. pp. 250.

(접수일 2007.3.26; 수락일 2007.8.2)