

# 오존이 기린초와 비비추의 광합성, 항산화효소, 해부학적 구조에 미치는 영향

정효정 · 우수영\* · 이성한 · 백생글

서울시립대학교 환경원예학과

## Photosynthesis, Antioxidant Enzyme, and Anatomical Difference of *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* to Ozone

Hyo-Cheng Cheng, Su Young Woo\*, Seong Han Lee, and Saeng Geul Baek

Department of Environmental Horticulture, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

**Abstract.** The objective of this study was to identify the effects of ozone on the two species in controlled environment. *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* were exposed in both control and ozone chamber to investigate photosynthesis, antioxidant enzyme activity, visible damage, the number and the size of stomata and the plastoglobuli. Ozone was fumigated in the concentration of  $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for 8 hours in a day (from 08:00 AM to 04:00 PM). Firstly, net photosynthesis of two species was decreased after ozone fumigation. Secondly, glutathione reductase activities showed significant difference between control and ozone treatment. Thirdly, visible symptoms of leaves were expressed such as chlorosis, necrosis and decoloration. Also, the size of stoma was significantly decreased in ozone-exposed plants. Furthermore, the intercellular space of *Hosta longipes* showed increased phenomenon because the mesophyll was collapsed. The number and the size of the plastoglobuli were significantly larger in ozone stress.

**Additional key words:** chlorosis, necrosis, plastoglobuli, stoma

### 서 언

선진국형 대기오염물질 가운데 대표적인 오존은 자동차와 공장 등에서 발생된 1차 오염물질이 고온 및 자외선이 있는 환경에서 광화학 반응을 거쳐 생성되며(Lee 등, 2005), 대도시 지역에서 많이 발생하는 것으로 알려져 있다(Ashmore, 2005; Woo 등, 2004a, 2004b, 2004c). 이러한 오존은 강한 독성을 가진 2차 대기오염물질의 하나로 가스의 형태로 존재하며 식물의 기공을 통해 유입되어 물질대사에 영향을 줄 수 있다(Kasuga 등, 1999; Krupa 등, 2001; Lee 등, 2002). 특히, 오존이 식물체 내부로 유입되면 세포 내에서 활성산소의 발생을 증가 시키며 이를 통해 각종 산화적 장애를 일으킨다(Asada, 1999). 또한, 광합성 관련 색소들의 파괴와 핵산, 단백질, 지질 등의 변성을 일으킬 수 있다(Lee 등, 2003; Park 등, 2002; Reig-Armiñana 등, 2004). 이러한 식물들이 최근 산업화에 따른 대기오염의 증가와 이러한 오염

에 노출되어 도심에 식재했을 때 오염물질의 영향과 피해를 받게 되어 그 역할과 기능을 잘 수행할 수 없게 된다. 이는 식물체에 가시적인 피해뿐만 아니라 만성적인 피해를 초래하며 식물체의 생장을 저해하고 나아가 도시의 미관에도 영향을 끼치게 된다.

지금까지는 오존 피해현상에 대해 은행나무, 느티나무, 양버즘나무 등 도심의 가로수종을 포함한 교목류만을 중심으로 식물 생리적 반응에 관한 연구가 많이 이루어져 왔다(Lee 등, 2004; Pääkkönen 등, 1998a, 1998b; Woo 등, 2004a, 2004b, 2004c). 도심 건축물의 옥상, 벽면 등의 인공지반 녹화 및 가로변의 식재처럼 녹지 공간의 장소와 형태가 다양해짐에 따라 교목·관목류 뿐 만 아니라 원예용 초화류와 지피류의 중요성도 높아지고 있다. 그 중 하층 피복용으로 사용되는 기린초와 비비추는 교목·관목 보다 경량이며 식재와 관리가 용이하여 장소에 구애받지 않고 사용될 수 있다. 또한 색깔, 형태와 질감이 풍부하고 초화류에 비해 수명이

\*Corresponding author: wsy@uos.ac.kr

※ Received 11 March 2009; Accepted 28 February 2010. 본 연구는 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2008-314-F00021)입니다.

길며 경제적이다. 또한 식재할 때 다양한 경관을 연출 할 수 있어 녹지공간이 절대적으로 부족한 도심에서 이들 수종은 녹지공간 확충을 위해 많이 사용된다.

그러므로 본 연구는 도심에서 많이 식재되는 기린초, 비비추를 대상으로 오존 가스 처리에 의한 광합성, 항산화효소활성과 현미경적 반응차이를 알아보기 위해서 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 시험재료

본 연구는 옥상녹화나 인공지반에 적합한 수종으로 알려진(Lee 등, 2007) 기린초(*Sedum kamtschaticum*)와 비비추(*Hosta longipes*)를 대상으로 유리 온실에서 수행되었다. 식물은 경기도 고양시 지피 식물원에서 2인치 포트 크기의 삽목묘를 수집하여 실험에 사용하였다. 원예용 상토를 사용하여 직경 10cm 화분에 이식하여 온실에서 7일간 순화시킨 후 오존 처리하였다.

### 오존 가스 처리

지상부가 20cm 정도 되도록 생육시킨 식물체를 주간(08:00-16:00) 23.0±1.0°C, 야간(16:00-08:00) 18.0±1.0°C, 습도 80.0±10.0%로 유지되는 밀폐형 자연광 챔버(150×150×200cm)로 옮겨 7일간 순화시킨 후 실험구의 챔버에만 오존 가스를 유입하였고 대조구의 챔버에는 오존가스를 유입하지 않았다. 오존 가스처리는 오존 발생기(DX100, Daqstation, Japan)를 통해 발생된 오존을 챔버 안으로 유입시켰으며, 농도의 모니터링은 화학 발광식 오존 자동 측정기를 이용하였다. 7월 12일부터 8월 8일까지 하루 8시간(08:00-16:00), 200µg·kg<sup>-1</sup>의 오존 가스를 처리하였고, 오존 가스 처리는 각각의 식물체에서 오존의 대표적인 가시피해가 나타나는 시점을 기준으로 실험하였다.

오존 농도는 하루 동안 주간 대기 중 존재하는 오존 농도 40 µg·kg<sup>-1</sup>를 초과하는 오존 농도의 합산한 값인 AOT40(accumulated exposure over a threshold of 40µg·kg<sup>-1</sup>)으로 나타냈고(Fuhrer 등, 1997; Ryang과 Woo, 2008; Vandermeiren 등, 2005), AOT40은 식 (1)을 이용하여 구하였다.

$$AOT40 = \sum_{j=i}^{j=i+90} \sum_{k \in \text{day}} (C_{i, k} - 40) \quad (1)$$

여기서, C<sub>i, k</sub>는 i일, k시간의 오존 농도이며, “k∈day”는 낮 시간의 합을 의미한다.

### 순광합성률과 호흡률

두 수종의 순광합성 능력과 호흡률은 LI-6400 휴대용 광합성 측정기(LI-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, USA)를 사용하여 자연광 챔버로 측정하였다. 광합성 측정 시 챔버 내부 온도는 22°C, CO<sub>2</sub>농도는 CO<sub>2</sub> injector system을 이용하여 400 µmol·mol<sup>-1</sup>로 유지하였다(Woo 등, 2004a). 순광합성량과 호흡률은 식 (2)를 이용하여 구하였다(Caemmerer과 Farquhar, 1981).

$$P_n = \frac{1}{100} \times \frac{U_e(C_e - C_c) \cdot C_c E}{S} \quad (2)$$

여기서, P<sub>n</sub>: net photosynthesis(µmol·CO<sub>2</sub>·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), U<sub>e</sub>: mole flow rate of air entering the leaf chamber(µmol·s<sup>-1</sup>), C<sub>e</sub>: mole fraction of CO<sub>2</sub> in the leaf chamber(µmol·CO<sub>2</sub>·mol<sup>-1</sup> air), C<sub>c</sub>: mole fraction of CO<sub>2</sub> entering in the leaf chamber(µmol·CO<sub>2</sub>·mol<sup>-1</sup> air), s: leaf area(cm<sup>2</sup>), E: transpiration(mmole·H<sub>2</sub>O·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)이다.

### Ascorbate peroxidase(APX) 활성

Ascorbate peroxidase(APX: EC 1.11.1.11)의 활성분석은 잎 단편 0.2g을 반응액(ascorbate acid, AsA) 1M, 인산칼륨인산염(pH 7.4) 100mM, EDTA 5mM, NaCl 0.1M]을 가하여 균질화 하였다. 이 용액을 4°C에서 15,000×g으로 15분간 원심분리 후 상층액 60µL을 취하여 반응액[H<sub>2</sub>O 2.43mL, 1M K-P buffer(pH 6.5) 300µL, 10mM AsA 180µL, 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 120µL]과 혼합하였다. 파장 290nm에서 90초간 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 아스코르빈산(AsA) 산화도를 측정해 단백질 1mg을 기준으로 효소 활성을 산정하였다(Lyons 등, 1999).

### Glutathione reductase(GR) 활성

Glutathione reductase(GR: EC 1.6.4.2)의 활성 분석은 잎 0.15g을 취한 후 반응액[K-P buffer 50mM, PVP 5%, DTT 5mM, EDTA 5mM, NaCl 0.1M]을 가하여 균질화 하였다. 이 용액을 4°C에서 15,000×g으로 15분간 원심분리를 한 후 상층액 150µL를 취하여 반응액[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 43mL, 1M K-P buffer(pH 7.8) 300µL, 10mM GSSG 60µL, 10mM NADPH 60µL]과 혼합하였다. 파장 340nm에서 흡광도 변화를 측정해 산화·환원 반응을 관찰하였다. 모든 효소 활성은 단백질 1mg을 기준으로 5배 희석액에 염 추출액 100:1로 가하여 반응시킨 후 파장 595nm에서의 흡광도를 측정함으로써 효소 활성을 산정하였다(Lyons 등, 1999).

## 가시적 피해증상

오존에 의한 피해현상은 가시적으로 관찰할 수 있으며, 대표적인 가시피해로 작은 반점, 갈색반점, 황화, 백화, 탈색 및 괴사(Pääkkönen 등, 1998a, 1998b; Scebba 등, 2003)등이 관찰된다. 오존 처리 시작 후 실험 수종의 잎에서 노란색 반점이나 갈색, 백화 등의 가시 피해현상이 처음 나타나는 시기를 기준으로 실험하였다.

## 기공 형태 및 크기

잎 기공관찰을 위해 시료를 실험 종료 후 즉시 채취하였다. 옆맥을 제외한 잎의 중심부위를 길이, 높이, 너비가 5×2×5mm 이내로 절취하여 신속히 고정액에 담가 4°C에서 2시간 고정 후 0.05M cacodylate 완충액(pH 7.2)을 10분 간격으로 3회 세척하고, 1% osmium tetroxide에 2시간 고정 후 증류수로 1-2회 세척하였다. 세척한 시료를 ethanol 농도 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 로 각 1회씩, 그리고 100% 로 3회 단계적으로 탈수하였고, 100% isoamylacetate에 15분씩 2회 세척 후 critical point dryer(CPD)를 사용하여 완전 건조시켰다. Metal stub와 carbon tape를 이용하여 시료를 부착시키고, 금박 코팅한 후 주사전자현미경(scanning electron microscopy; SEM) (JSM 5410LV, Jeol, Tokyo, Japan)으로 검정하였다(Bussotti 등, 2003). 또한 단위면적(500 x 500µm)당 기공의 수와 크기를 범용 광학 현미경(Axiophot, Zeiss, Germany)으로 관찰하여 측정하였다.

## 해부학적 관찰

실험 종료 후 즉시 채취한 시료로 식물체의 잎 중심부위를 길이, 높이, 너비가 1mm 이내로 절취하여 신속히 고정액에 담고 4°C에서 2시간 고정 후 0.05M cacodylate 완충액(pH 7.2)을 10분 간격으로 3회 세척, 1% osmium tetroxide

에 2시간 고정 후 증류수로 1-2회 세척하였다. 0.5% uranyl acetate 용액에서 염색 후, 4°C로 유지하여 24시간 동안 보관했다. 세척한 시료를 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% ethanol에 3회 각각 10분씩 단계적으로 탈수 하였고, 탈수 및 치환을 목적으로 propylene oxide로 15분씩 2회 처리하였다. 포매제인 spurr와 propylene oxide를 1:1 로 섞은 용액에 2시간 담고 침투시킨 후, 100% spurr에 4시간 이상 침투시켰다. 100% spurr를 새로 갈아준 뒤 다시 2시간 이상 침투시켰다. 포매틀은 라벨과 함께 하루 전에 70°C 오븐에 넣어 수분을 완전히 제거한 후 새로 만든 spurr를 평판형 포매틀(embedding mold)에 넣었다. 시료를 포매틀에 치상 할 때 시료의 위치는 블록의 끝 부분에 오도록 하여 포매제를 약간 볼록하게 채운 후, 70°C 오븐에 넣고 8시간이상 중합시켰다. 절편을 제작하고 염색을 한 후, 범용 광학현미경(Axiophot, Zeiss, Germany)과 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy; TEM)(JEM 1010, Jeol, Tokyo, Japan)으로 검정하였다(Bussotti 등, 2003).

## 결과 및 고찰

### 순광합성률과 호흡률

오존에 노출된 식물의 경우 일반적으로 광합성이 감소하고 호흡률이 증가한다(Reig-Armiñana 등, 2004; Youn, 1999). 오존 처리 후 기린초와 비비추에서 측정된 순광합성률은 정도의 차이는 있지만 모두 감소하였다(Fig. 1A, B). 특히 기린초의 경우에는 오존 처리로 인해서 야간의 호흡률이 특히 20:00-04:00정도의 시간대에 비비추에 비해서 대폭 증가하였다(Fig. 1A). 비비추의 경우 오존 처리전과 후의 차이가 크게 나타나지 않았다(Fig. 1B). 기린초가 상대적으로 비비추에 비하여 오존에 대해서 피해를 많이 받아서 광합성능력

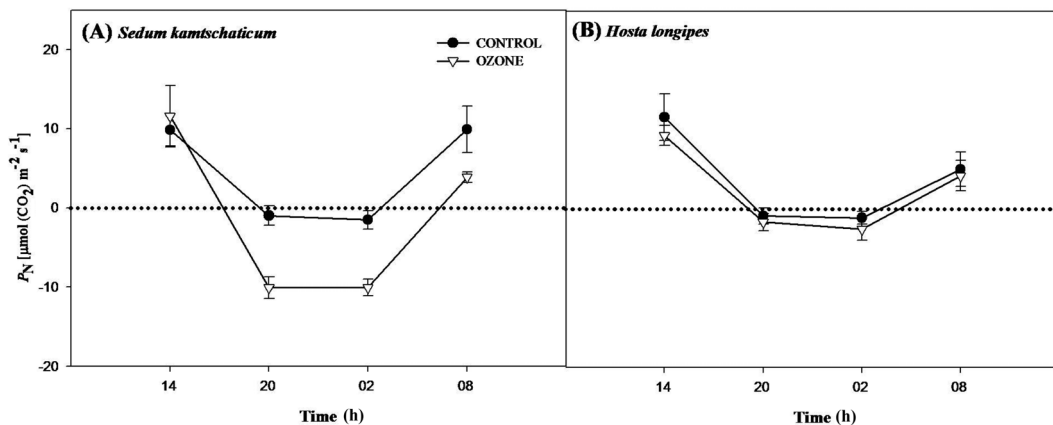


Fig. 1. Net photosynthetic rates ( $P_N$ ) and respiration at the night of *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* exposed to 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ozone. Bars indicate standard error ( $n = 5$ ).

이 감소된 것을 확인하였다. 또한 오존에 의해서 식물체에 발생한 피해를 복구하기 위해서 호흡량이 증가 되었다고 할 수 있다(Lee 등, 2005; Woo 등, 2004c). 광합성 감소현상은 식물체의 성장과 수확량 감소를 동반하게 되며 동화 산물의 분배 양상에도 영향을 미치게 된다(Woo 등, 2004b). 광합성률의 감소는 항산화효소의 활성과 밀접한 관련이 있다. 따라서 기린초의 GR의 활성이 오존처리구에서 대조구에 비해 통계적으로 유의하게 차이가 없는 것은(Table 3) 기린초가 오존이 식물체내로 유입되어서 발생하는 활성산소를 많이 감소시키지 못했기 때문이다. 반면에 비비추의 광합성률이 오존처리구에서 대조구에 비해 많이 감소하지 않은 것은(Fig. 1B) 오존의 유입으로 생성된 활성산소를 GR이 소거하는 항산화작용이 작동한 것으로 설명할 수 있다(Lyons 등, 1999; Strohm 등, 2002). 이것은 비비추에서 GR의 활성이 오존처리구에서 대조구보다 통계적으로 유의한 결과를 통해서 확인할 수 있다(Table 3).

#### Ascorbate peroxidase 활성

일반적으로 식물 체내에 대기오염물질이 흡수되면 세포 내 각종 활성산소가 발생되며 APX는 활성 산소를 독성이 약한 쪽으로 완화시키는 작용을 하는 대표적인 항산화 효소이다(Woo 등, 2004a, 2004b, 2004c). 또한 APX는 식물 체내에 유입된 물질의 독성을 저하시키기 위한 여러 물질을 생성하며, 과산화수소( $H_2O_2$ ) 형태인 활성산소를 물로 완전 해독 하계하는 물질이다(Strohm 등, 2002; Woo 등, 2004a). 오존에 노출된 기린초와 비비추의 APX함량을 조사한 결과, 기린초의 APX함량이 대조구  $0.031\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 에 비하여 실험구가  $0.059\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 로 약 90% 증가(Lyons 등, 1999; Woo 등, 2004a)되어 나타났고(Table 3), 비비추는 대조구  $0.061\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 와 비교하여 실험구가  $0.052\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 로 약 15% 정도 감소하는 경향을 보였지만 통계적으로는 유의한 차이가 없었다(Table 3). 이는 식물체의 광합성 관련 효소나 오염물질을 해독하려는 능력에 따라 저항성과 항산화 능력이 다르다는 것을 제시할 수 있으며(Calatayud 등, 2002; Chernikova 등, 2000; Woo 등, 2004b), 기린초의 경우 APX 활성이 증가한 것은 항산화 기구의 작동이 이루어진 것으로 생각된다.

#### Glutathione reductase 활성

GR은 APX와 함께 대표적인 항산화 효소가운데 하나이며 식물에서 노화를 지연시키는 대표적인 항산화 효소(Woo 등, 2004a, 2004c)이다. 전자 전달계로부터 NADPH를 전자 공여체로 하여 항산화제 glutathione을 환원시키는 것이 GR

이며 일반적으로 스트레스를 받는 식물은 항산화 작용을 통해 식물 체내에서 GR이 증가한다(Schraudner 등, 1998; Strohm 등, 2002). 오존  $200\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  처리 후의 GR활성을 조사한 결과, 비비추에서 오존 처리 후 GR활성이 대조구가  $3.320\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 에 비하여 실험구는  $8.679\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 로 약 61% 증가하고 통계적으로도 유의한 것으로 나타났다(Table 3). 반면, 기린초에서는 대조구는  $0.554\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 에 비하여 실험구가  $0.492\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 로 약 12.8% 감소되어 나타났다. 본 실험에서 GR활성이 증가한 것은 대기오염물질 중 기공을 통해서 들어온 오존이 식물체내에서 활성산소( $O_2$ )로 전환되고 이를 해독하는 과정에서 비비추의 GR활성이 상대적으로 증가(Woo 등, 2004c)한 것이므로, 오존 처리한 비비추에서 GR의 활성이 높다는 것은 식물 체내 항산화 기능이 잘 이루어지고 있다는 간접적인 증거가 될 수 있다(Woo 등, 2004a, 2004c). 이는 앞에서 언급한 것처럼 비비추의 광합성과 호흡률이 오존처리구에서 대조구와 비슷하게 유지된 결과와 밀접한 관련이 있다(Fig. 1B).

#### 가시적 피해증상

일반적으로 식물은 오존 등 대기오염과 같은 스트레스에 의해 엽록소가 파괴되고, 가시적으로 황화 혹은 백화현상, 만성적인 병반, 괴사, 반점 등이 나타난다(Krupa 등, 2001; Lee 등, 2005; Novak 등, 2003; Pääkkönen 등, 1997, 1998a). 실험에서도 오존 가스 처리에 따른 가시적인 피해인 작은 반점, 갈색반점, 황화, 백화, 탈색 및 괴사 등이 나타났다. 기린초는 잎 전체가 노란색을 띄며, 중심 부위와 잎 가장자리가 괴사되어 검은 색으로 변화였고 약간 붉은 빛의 점들이 나타났다. 비비추의 경우 전형적인 오존 피해에 따른 증상인 노란색의 얼룩이 잎 전체에 나타났다. Youn(1999)의 aspen의 오존처리 연구에서도 오존에 장시간 노출된 식물의 경우 주로 광합성 등 생리적 대사과정에 영향을 주어 식물 생장이 줄어들었으나 가시적인 피해는 나타나지 않은 반면, 단시간 노출된 식물의 경우 생리적인 대사과정의 영향 보다는 가시피해가 증가된다고 보고하였다. 이는 오존에 장시간 노출된 기린초의 광합성률이 감소하였고, 오존에 단시간 노출된 비비추에서는 광합성률의 변화가 거의 없었던 것과 더불어 설명할 수 있다.

가시적인 피해가 나타난 시점을 기준한 현상은 오존 농도를 합산한 값인 AOT40으로 나타낼 수 있다. 이것은 대기 중 존재하는 오존  $40\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 를 초과하는 값의 합으로써  $3,000\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$ 을 초과할 때 식물에서 광합성률의 변화와 같은 부정적인 영향이 나타나는 것으로 알려져 있다(Fuhrer 등, 1997; Gerosa 등, 2003; Ryang과 Woo, 2008). 이는 오존

**Table 1.** AOT 40 of *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* exposed to 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ozone.

| Plant species              | AOT 40 <sup>z</sup> ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) |
|----------------------------|--|
| <i>Sedum kamtschaticum</i> | 35,840   |
| <i>Hosta longipes</i>      | 8,960  |

<sup>z</sup>AOT 40 (Accumulated dose over a threshold of 40  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) is the sum of the differences between the hourly mean ozone concentration (in ppb) and 40  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for each hour when the concentration exceeds 40  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , accumulated during daylight hours.

처리에 따른 가시피해현상과 더불어 설명 할 수 있다. 오존 처리 결과 기린초의 AOT40은 35,840 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$ 로 황화, 괴사와 검은 반점과 같은 가시피해가 나타났으며, 비비추의 AOT40은 8,960 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$ 로 탈색과 황화 같은 형태로 나타났다(Table 1). 이처럼 수종마다 오존에 대해서 다른 가시적인 피해현상을 보이는 것은 아마도 각기 다른 항산화 체계를 가지고 있기 때문인 것으로 짐작된다(Woo 등, 2004a).

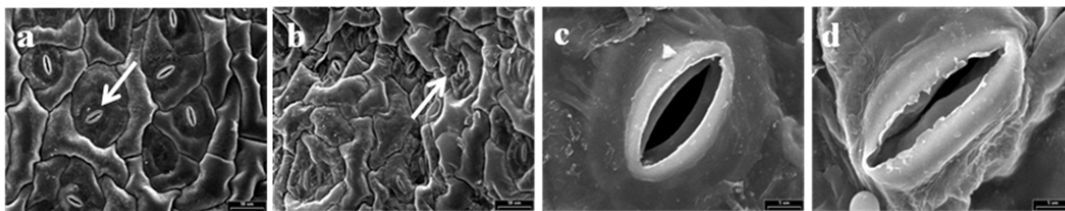
### 기공 형태 및 크기

오존은 식물체가 일반적인 가스 교환을 하는 동안 기공을 통해 식물체 내부로 유입이 된다(Severino 등, 2007). 가스 형태 오염물질의 유입통로로 쓰이는 기공을 연구함으로써 식물의 상태를 간접적으로 판단 할 수 있으며, 오존스트레스에 대한 지표로 이용 할 수 있다(Ryang 등, 2007). 기공은 단합을 통해 탄소 유입을 제한할 수 있고 이는 식물의 생장 과정에서 매우 중요한 역할을 한다. 기공은 오존의 산화력으로 인해 피해를 받게 되며, 기공의 손상은 광합성률의 감소로 이어지고 식물생장과 생산량을 감소시킨다(Sant'-Anna-

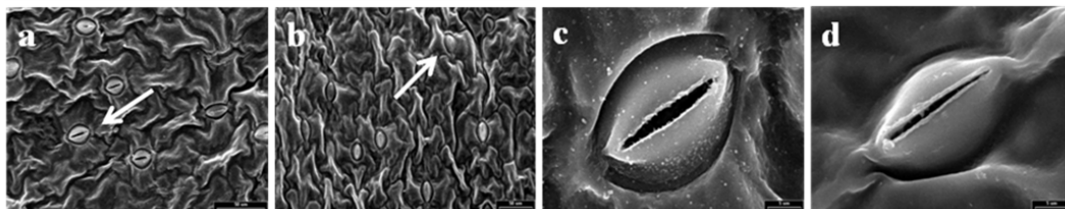
Santos 등, 2006). 오존가스 처리 후 주사전자현미경(SEM)으로 기공을 관찰한 결과 기린초와 비비추의 잎 표면에서 기공주변 표피세포가 부풀어 오르고 기공이 변화된 상태가 관찰되었다(Fig. 2A, B). 기린초에서 오존처리에 따른 기공의 개폐 기능이 상실되어 기공이 열려 있고 기공세포가 부풀고 산화되어 기공입구가 탄력성을 잃었다(Fig. 2A-d). 비비추는 기공이 닫혀진 형태를 보이는데(Fig. 2B-d), 오존에 노출시 기공이 폐쇄되는 현상으로 기공에 대한 공변세포의 직접적인 오존효과로 볼 수 있고 이는 식물의 오존에 대한 기공 작용으로써 오존이 식물체내로 유입되는 것을 차단(Lee 등, 2004; Park 등, 2002)한 것으로 보인다. Lee 등(2004)의 연구에서 기공폐쇄 현상은 오존 노출시간과 수종에 따라 다양하게 나타나는데, 수종에 따라 기공 개폐 현상이 계속해서 유지되는 것이 아니라 기공개폐와 개방이 교대로 나타나며, 오존에 노출 시간이 길어질수록 식물의 기공은 기능을 상실하여 결국 기공의 개폐작동이 원활치 않게 된다.

식물이 생육하면서 오존 스트레스를 받으면 잎 면적에 차이를 가져오게 되고 이는 기공의 크기와 숫자에 차이를 가져오게 되어 단위면적당 기공의 수가 증가한다는 결과가 보고된 바 있다(Pääkkönen 등, 1998b). 본 연구에서 오존 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  처리 후 단위면적(500×500 $\mu\text{m}$ )당 기공 수와 기공 크기의 변화를 관찰한 결과, 오존의 피해를 받은 기린초의 경우 통계적으로 유의하지는 않지만 단위 면적당 기공의 수가 116개로 오존 처리 전 기공 96개 보다 많다. 비비추의 경우 115개로 오존 처리 전 84개에 비하여 통계적으로 차이를 보이며 증가했다(Table 2). 식물체의 잎 표피세포의 감소

(A) *Sedum kamtschaticum*



(B) *Hosta longipes*



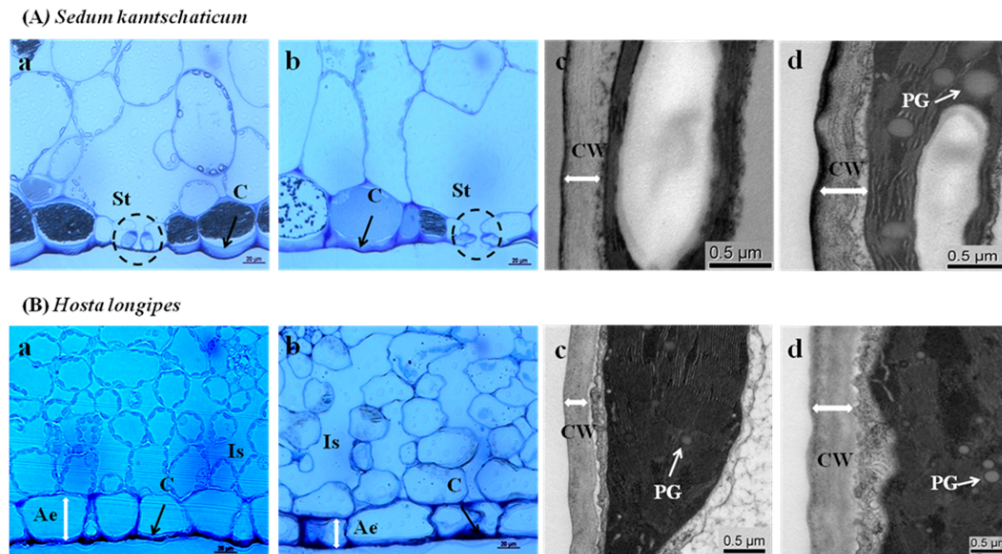
**Fig. 2.** Abaxial epidermis of (A) *Sedum kamtschaticum* and (B) *Hosta longipes* observed by scanning electronic microscopy (SEM). a, abaxial epidermis in control; b, abaxial epidermis in ozone treatment; c, stomata shape in control; d, stomata shape in ozone treatment. Arrows indicate stomata of leaves. Stomata deformed in leaves exposed to 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ozone.

**Table 2.** Differences of stomata, adaxial epidermis, cell wall, and plastoglobuli between *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* exposed to 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ozone.

| Plant species              | Treatment <sup>z</sup> | Stomata              |                          | Adaxial epidermis        | Cell wall                   | Plastoglobuli       |                            |
|----------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------|----------------------------|
|                            |                        | Number               | Length ( $\mu\text{m}$ ) | Length ( $\mu\text{m}$ ) | Thickness ( $\mu\text{m}$ ) | Number              | Diameter ( $\mu\text{m}$ ) |
| <i>Sedum kamtschaticum</i> | Control                | 95.67 <sup>y</sup>   | 37.80                    | 23.61                    | 0.37                        | 1.67                | 0.29                       |
|                            | Ozone                  | 116.00 <sup>ns</sup> | 32.30 <sup>***</sup>     | 45.83 <sup>ns</sup>      | 0.26 <sup>*</sup>           | 8.33 <sup>**</sup>  | 0.55 <sup>*</sup>          |
| <i>Hosta longipes</i>      | Control                | 84.00                | 30.24                    | 39.77                    | 0.32                        | 7.33                | 0.14                       |
|                            | Ozone                  | 114.67 <sup>**</sup> | 28.46 <sup>**</sup>      | 25.52 <sup>**</sup>      | 0.68 <sup>ns</sup>          | 13.33 <sup>**</sup> | 0.62 <sup>*</sup>          |

<sup>z</sup>Ozone exposed to 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for 8 hours per days (July 12 to Aug 8).

<sup>y</sup>Student's *t*-test indicate statistical differences between control and treatment at 0.05 significant (\*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , ns: non significant at  $p > 0.05$ ). Means  $\pm$  standard error ( $n = 5$ ).



**Fig. 3.** Adaxial shapes observed by photo microscopy and plastoglobuli distribution and cell wall thickness by transmission electron microscopy of (A) *Sedum kamtschaticum* and (B) *Hosta longipes*. a, adaxial shapes in control; b, adaxial shapes in ozone treatment; c, plastoglobuli distribution and cell wall thickness in control; d, plastoglobuli distribution and cell wall thickness in ozone treatment. C, cuticle; Is, intercellular spaces; Ae, abaxial epidermis; St, stomata; CW, cell wall; PG, plastoglobuli. Arrows indicate cuticle of leaves. Leaves exposed to 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ozone.

에 따른 기공의 크기는 스트레스를 받은 경우 작아지며, 광합성속도를 높이려는 식물자체의 보상작용으로 기공의 밀도를 증가시킨다(Lee 등, 2008). 식물체의 기공 크기는 통계적으로 유의하게 감소하였는데 오존의 처리를 한 기린초가 평균 32.3 $\mu\text{m}$ 로 대조구보다 약 10% 감소하였으며, 비비추는 오존 처리 후 평균 28.46 $\mu\text{m}$ 로 대조구 보다 약 5.9% 감소하였다(Table 2).

#### 세포내 플라스토글로블리(plastoglobuli)

대기 오염 물질에 의해 발생한 활성산소는 각종 산화적 장해를 일으키고(Chemikova 등, 2000; Lee 등, 2003), 생체 물질과 반응성이 높기 때문에 광합성 관련 색소들의 파괴, 핵산, 단백질, 지질 등의 변성을 일으킨다고 보고하였다(Lee 등, 2003; Park 등, 2002; Reig-Armiñana 등, 2004). 이를 바탕으로 오존에 노출된 잎에서의 활성산소 발생에 따른 해부학적 변화를 범용 광학현미경을 통해 관찰한 결과(Fig. 3),

기린초는 오존처리 후 하표피(adaxial epidermis)의 두께가 23.61 $\mu\text{m}$ 에서 45.83 $\mu\text{m}$ 으로 두꺼워졌다(Table 2). 반면, 비비추는 하표피(adaxial epidermis)의 두께가 대조구 39.77 $\mu\text{m}$ 에 비하여 25.52 $\mu\text{m}$ 로 약 35.83% 유의성 있게 얇아진 것을 관찰 할 수 있었다(Table 2). 이는 식물체의 세포벽이 오존 가스의 산화력으로 인해 식물체의 표피세포 두께의 변화를 가져왔다(Pääkkönen 등, 1995a)고 할 수 있다.

한편, 비비추의 오존 처리 후 세포 관찰 결과 세포 내 간극이 커졌으며 이러한 세포의 변화는 오존 처리된 잎의 가시적인 피해를 확대시킬 수 있다(Ferdinand 등, 2000). 이러한 식물체내 세포의 간극이 커지는 것은 식물체 내부의 가스교환이 빠르게 일어나 광합성 효율을 증가시키려는 현상으로 오존 피해에 따른 식물체의 반응이라 할 수 있다(Anttonen 와 Kärenlampi, 1996; Ferdinand 등, 2000; Loreto 등, 2001; Pääkkönen 등, 1995b).

플라스토글로블리는 스트레스 받은 식물을 판단할 수 있

**Table 3.** Ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) activity of *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* exposed to 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ozone.

| Plant species              | Treatment | Ascorbate peroxidase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) | Glutathione reductase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) |
|----------------------------|-----------|--|---|
| <i>Sedum kamtschaticum</i> | control   | 0.031 <sup>z</sup>   | 0.554   |
|                            | ozone     | 0.059 <sup>NS</sup>  | 0.492 <sup>NS</sup>   |
| <i>Hosta longipes</i>      | control   | 0.061  | 3.320   |
|                            | ozone     | 0.052 <sup>NS</sup>  | 8.679*  |

<sup>z</sup>Student's *t*-test indicates statistical differences between control and treatment at 0.05 significant (\*:  $p < 0.05$ , ns: non significant at  $p > 0.05$ ). Means  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ).

는 지표로 이용되는 물질이다(Bréh lin 등, 2007). 플라스틱 글로블리의 변화는 빛 스트레스, 노화스트레스 및 대기오염에 피해를 받은 식물체에서 관찰할 수 있으며, 시기 상조한 노화에 따른 전형적인 형태로 나타나진다(P akk nen 등, 1997). 오존 스트레스 처리에 따른 잎의 해부학적 변화 정도를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과, 기린초와 비비추 모두에서 플라스틱글로블리의 수와 크기가 유의성 있게 증가했다(Anttonen와 K renlampi, 1996; Br h lin 등, 2007; Mikkelsen과 Heide-J rgensen, 1996; Miyake 등, 1989; P akk nen 등, 1997, 1998a)(Table 2). 이는 오존 가스 처리에 의해 식물체가 스트레스를 받았다는 증거이며, 식물체의 세포벽의 변화에도 영향을 끼친다. 세포벽의 두께는 오존 처리 후 두꺼워지면 해독능력을 보이는 것이며, 반대로 얇아지면 해독능력이 감소한다(Rinnan과 Holopainen, 2004)고 알려져 있다. 기린초는 세포벽의 두께가 대조구( $0.37\pm 0.03\mu\text{m}$ )보다 실험구( $0.26\pm 0.01\mu\text{m}$ )가 약 30% 정도 유의하게 감소하고 형태가 변형 되었으며(G nthardt-Goerg 등, 1993; Oksanen 등, 2001), 전분이 줄어드는 형태를 보였다(G nthardt-Goerg 등, 1993; Loreto 등, 2001; P akk nen 등, 1997)(Table 2). 반면 비비추는 통계적으로 유의하지 않지만 대조구( $0.32\pm 0.01\mu\text{m}$ )에 비하여 실험구( $0.68\pm 0.09\mu\text{m}$ )가 약 53% 정도 세포벽이 두꺼워졌으며(Oksanen 등, 2001), 이것은 오존노출의 AOT40 과 더불어 설명될 수 있다.

## 초 록

이 연구의 도심 녹화 수종으로 가장 많이 이용되는 기린초(*Sedum kamtschaticum*)와 비비추(*Hosta longipes*)를 대상으로 오존에 의해 나타나는 광합성률, 항산화 효소활성, 해부학적 차이를 구명하기 위하여 수행되었다. 오존을 하루 8 시간씩(08:00-16:00)  $200\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  처리하였다. 대조구를 설정하고 광합성률, 항산화 효소활성, 해부학적 특성(기공, 플라스틱글로블리의 크기 등)을 조사하였다. 그 결과, 오존처리 후 측정된 순광합성량은 두 식물 중에서 감소하였고 호

흡률은 증가하였다. 오존처리 후 비비추의 경우 glutathione reductase의 활성이 통계적으로 유의하게 증가하였다. 기린초와 비비추는 황화, 백화 및 반점 등의 전형적인 오존 피해 증상을 나타내었다. 오존 처리후 기린초와 비비추의 단위면적당 기공의 수는 증가하였으며, 기공크기는 유의성 있게 감소하였다. 대기오염에 피해 받은 식물에서 관찰 할 수 있는 플라스틱글로블리의 수가 기린초와 비비추에 있어 유의성 있게 증가하고 그 직경도 증가하였다.

추가 주요어 : 황화, 괴사, 플라스틱글로블리, 기공

## 인용문헌

- Anttonen, S. and L.K renlampi. 1996. Slightly elevated ozone exposure causes cell structural changes in needles and roots of Scots pine. *Trees* 10:207-217.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:601-39.
- Ashmore, M.R. 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell Environ.* 28:949-964.
- Br h lin, C., F. Kessler, and K.J. Wijk. 2007. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends Plant Sci.* 12:260-266.
- Bussotti, F., R. Tognelli, G. Montagni, F. Borghini, P. Bruschi, and C.Tani. 2003. Reponse of *Quercus pubescens* leaves exposed to geothermal pollutant input in southern Tuscany (Italy). *Environ. Pollut.* 121:349-361.
- Caemmerer, S. and G.D. Farquhar. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376-387.
- Calatayud, A., J.W. Ramirez, D.J. Iglesias, and E. Barreno. 2002. Effects of ozone on photosynthetic  $\text{CO}_2$  exchange, chlorophyll *a* fluorescence and antioxidant systems in lettuce leaves. *Physiol. Plant.* 116:308-316.
- Chernikova, T., J.M. Robinson, E.H. Lee, and L. Mulchi. 2000. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosyn. Res.* 64:15-26.
- Ferdinand, J.A., T.S. Fredericksen, K.B. Kouterick, and J.M. Skelly. 2000. Leaf morphology and ozone sensitivity of two open pollinated genotypes of black cherry (*Prunus serotina*)

- seedlings. *Environ. Pollut.* 108:297-302.
- Fuhrer, J., L. Skärby, and M.R. Ashmore. 1997. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environ. Pollut.* 97:91-106.
- Gerosa, G., S. Cieslik, and A. Ballarin-Denti. 2003. Micrometeorological determination of time-integrated stomatal ozone fluxes over wheat: a case study in Northern Italy. *Atmospheric Environ.* 37:777-788.
- Günthardt-Georg, M.S., R.Matyssek, C. Scheidegger, and T. Keller. 1993. Differentiation and structural decline in the leaves and bark of birch (*Betula pendula*) under low ozone concentrations. *Trees* 7:104-114.
- Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.* 17:287-291.
- Krupa, S., M.T. McGrath, C.P. Andersen, F.L. Booker, K.O. Burkey, A.H. Chappelka, B.I. Chevone, E.J. Pell, and B.A. Zilimskas. 2001. Ambient ozone and plant health. *Plant Dis.* 85:4-12.
- Lee, J.C., C.S. Kim, S.H. Han, and P.G. Kim. 2004. Stomatal and photosynthetic responses of *Betula* species exposed to ozone. *Kor. J. Agr. For. Meteorol.* 6:11-17.
- Lee, J.C., C.Y. Oh, S.H. Han, and P.G. Kim. 2005. Changes on photosynthesis and SOD activity in *Platanus orientalis* and *Liriodendron tulipifera* according to ozone exposing period. *Kor. J. Agr. For. Meteorol.* 7:156-163.
- Lee, J.C., S.H. Han, K.W. Kwon, S.Y. Woo, and J.H. Choi. 2003. Changes of photosynthetic pigment contents and SOD activity in the leaves of four tree species exposed to SO<sub>2</sub>. *Kor. J. Agr. For. Meteorol.* 5:18-23.
- Lee, J.C., S.H. Han, S.S. Jang, K.J. Cho, and Y.Y. Kim. 2002. Effects of ozone uptake rate on photosynthesis and antioxidant activity in the leaves of *Betula* species. *Kor. J. Agr. For. Meteorol.* 4:72-79.
- Lee, S.H., E.J. Hahn, and K.Y. Park. 2008. Nitrogen source and sucrose concentration in the medium affect indian ginseng (*Withania domniefera*) cultures in vitro. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26:306-312.
- Loreto, F., M. Mannozi, C. Maris, P. Nascetti, F. Ferranti, and S. Pasqualini. 2001. Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant physiol.* 126:993-1000.
- Lyons, T., J.H. Ollerenshaw, and J.D. Barnes. 1999. Impacts of ozone on *Plantago major*: apoplastic and symplastic antioxidant status. *New Phytologists* 141:253-263.
- Mikkelsen, T.N. and H.S. Heide-Jørgensen. 1996. Acceleration of leaf senescence in *Fagus sylvatica* L. by low levels of tropospheric ozone demonstrated by leaf colour, chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure. *Trees* 10:145-156.
- Miyake, H., H. Matsumura, Y. Fujinuma, and T. Tosuka. 1989. Effects of low concentrations of ozone on the fine structure of radish leaves. *New Phytol.* 111:187-195.
- Novak, K., J.M. Skelly, M. Schaub, N. Krauchi, C. Hug, W. Landolt, and P. Bleuler. 2003. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environ. Pollut.* 125:41-52.
- Oksanen, E., J. Sober, and D.F. Karnosky. 2001. Impacts of elevated CO<sub>2</sub> and / or O<sub>3</sub> on leaf ultrastructure of aspen (*Populus tremuloides*) and birch (*Betula papyrifera*) in the Aspen FACE experiment. *Environ. Pollut.* 115:437-446.
- Park, E.H., J.K. Kim, J.C. Lee, and S.H. Han. 2002. Photosynthetic pigment concentrations and change of SOD activities on liana, *Equisetum arvense* and *Artemisia princeps* exposure to ozone. *Kor. J. Agr. For. Meteorol.* 4:159-163.
- Pääkkönen, E., J. Vahala, M. Pohjola, T. Holopainen, and L. Kärenlampi. 1998a. Physiological, stomatal and ultrastructural ozone responses in birch (*Betula pendula* Roth) are modified by water stress. *Plant Cell Environ.* 21:671-684.
- Pääkkönen, E., M.S. Günthardt-Goerg, and T. Holopainen. 1998b. Responses of leaf processes in a sensitive birch (*Betula pendula* Roth) clone to ozone combined with drought. *Ann. Bot.* 82:49-59.
- Pääkkönen, E., T. Holopainen, and L. Kärenlampi. 1995a. Ageing-related anatomical and ultrastructural changes in leaves of Birch (*Betula pendula* Roth.) clones as affected by low ozone exposure. *Ann. Bot.* 75:285-294.
- Pääkkönen, E., T. Holopainen, and L. Kärenlampi. 1995b. Effects of ozone on birch (*Betula pendula* Roth.) clones. *Water, Air, Soil Pollut.* 85:1331-1336.
- Pääkkönen, E., T. Holopainen, and L. Kärenlampi. 1997. Differences in growth, leaf senescence and injury, and stomatal density in Birch (*Betula pendula* Roth.) in relation to ambient levels of ozone on Finland. *Environ. Pollut.* 96:117-127.
- Rinnan, R. and T. Holopainen. 2004. Ozone effects on the ultrastructure of peatland plants: *Sphagnum Mosses*, *Vaccinium oxycoccs*, *Andromeda polifolia* and *Eriophorum vaginatum*. *Ann. Bot.* 94:623-634.
- Ryang, S.Z. and S.Y. Woo. 2008. Stomata density and size of *Acer palmatum* to the elevated ozone. *J. Kor. For. Soc.* 97:552-554.
- Ryang, S.Z., S.Y. Woo, and S.M. Je. 2007. Antioxidant enzyme, chlorophyll contents and stomatal changes of five tree species under ozone stress. *J. Kor. For. Soc.* 96:470-476.
- Reig-Armiñana, J., V. Calatayud, J. Cerveró, F.J. García-Breijo, A. Ibars, and M.J. Sanz. 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). *Environ. Pollut.* 132:321-331.
- Sant'Anna-Santos, B. F., L.C. Silva, A.A. Azevedo, and R. Aguiar. 2006. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa Americana* L. (Rubiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technol.* 49:313-321.
- Scebba, F., G. Soldatini, and A. Ranieri. 2003. Ozone differentially affects physiological and biochemical responses of two clover species; *Trifolium repens* and *Trifolium pratense*. *Environ. Pollut.* 123:209-216.
- Schraudner, M., W. Moeder, C. Wiese, W.V. Camp, D. Inze, C. Langebartels, and H. Sandermann Jr. 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The Plant Journal* 16:235-245.
- Severino, J.F., K. Stich, and G. Doja. 2007. Ozone stress and antioxidant substances in *Trifolium repens* and *Centraurea jacea* leaves. *Environmental Pollution* 146:707-714.
- Strohm, M., M. Elblmeier, C. Langebartels, L. Jouanin, A. Polle, H. Sandermann and H. Rennenberg. 2002. Responses of



- antioxidative systems to acute ozone stress in transgenic poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) over-expressing glutathione synthetase or glutathione reductase. *Trees* 16:262-273.
- Vandermeiren, K., C. Black, H. Pleijel, and L.D. Temmerman. 2005. Impact of rising tropospheric ozone on potato: effects on photosynthesis, growth, productivity and yield quality. *Plant Cell Environ.* 28:982-996.
- Woo, S.Y., S.H. Lee, K.W. Kwon, and J.C. Lee. 2004a. Chlorophyll contents and glutathione reductase activity of *Ailanthus altissima*, *Liriodendron tulipifera* and *Platanus occidentalis* seedling to the ozone exposure. *J. Kor. For. Soc.* 93:423-427.
- Woo, S.Y., S.H. Lee, K.W. Kwon, J.C. Lee, and J.H. Choi. 2004b. Growth, photosynthesis, and ascorbate peroxidase activity of several species to the ozone exposure. *J. Kor. For. Soc.* 93:409-414.
- Woo, S.Y., S.H. Lee, and D.S. Lee. 2004c. Air pollution effects on the photosynthesis and chlorophyll contents of street trees in seoul. *Kor. J. Agr. For. Meteorol.* 6:24-29.
- Youn, S.C. 1999. Ozone effects on plants- the responses of two aspen clones to chronic and dynamic exposures. *Kor. Soc. Atmo. Environ.* 1:87-91.