

기린초와 비비추의 오존에 대한 생리·생화학적 반응

정효정 · 우수영* · 이성한 · 광명자 · 김경남

서울시립대학교 환경원예학과

Physiological and Biochemical Responses of *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* to Ozone Stress

Hyo Cheng Cheng, Su Young Woo*, Seong Han Lee, Myeong Ja Kwak, and Kyeong Nam Kim

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

Abstract. In this study, the resistance to ozone and characteristics of ozone-induced damage were investigated on the perennial ground cover plant species. *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* were exposed to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ozone for 8 hours per day (from 08:00 to 16:00) in the naturally irradiated phytotron. The extent of ozone-induced damage was measured through the analysis of physiological parameters, such as water use efficiency (WUE), chlorophyll content (Chl. *a*, Chl. *b*, Chl. *a* + *b*, and Chl. *a/b* ratio), carotenoid contents, and the induction of reactive oxygen species (ROS). Ozone exposure significantly reduced the daytime WUE in both species. The contents of chlorophyll and carotenoid were also decreased and ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide radical (O_2^-) were accumulated after ozone exposure. The above results of this study suggested that *S. kamtschaticum* is more resistant to atmospheric ozone than *Hosta longipes*. Considering its fast responses to ozone, it was also assumed that *Hosta longipes* can be used as an indicator plant of an increase in atmospheric ozone concentration.

Additional key words: hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide radical (O_2^-), water use efficiency (WUE)

서 언

산업화로 인해 도시 내 녹지 부족 현상이 심각해짐에 따라 도시민을 위한 녹지공간의 요구도가 증가되고 있다 (Cheng et al., 2010). 하지만 도심은 대기오염이 심한 지역이며 다른 오염물질은 대체적으로 연 평균농도가 낮아지는 반면 오존은 오히려 계속 증가하고 있는 추세로 최근 전국 여러 도시들에서 빈번하게 발생하고 있으며 고농도 오존사례는 갈수록 심화되는 경향을 보이고 있다 (Kim et al., 2001). 따라서 도심에 식재된 식물은 오존을 비롯한 대기오염에 의해 심각한 피해를 받을 수 있다 (Cheng et al., 2010).

오존이 식물체 내부로 들어 왔을 때 식물자체의 해독대사에는 다양한 항산화 방어계가 관여하는데 식물체 내 활성산소종 발생에 대한 방어 기작에서 항산화효소의 활성은 중요

한 역할을 한다 (Woo et al., 2004a). 오존 자체보다도 생체물질과 반응이 높은 활성산소는 광합성 관련 색소들의 파괴와 핵산, 단백질, 지질 등의 변성을 일으키고 (Lee et al., 2003; Park et al., 2002), 식물체에 가시적인 피해뿐 아니라 만성적인 피해를 초래하여 식물체의 성장을 저해 한다. 최근에는 여름철 오존주의보가 발령될 정도로 오염물질이 도시민의 생활에도 문제가 되고 있으며 (Woo et al., 2004a), 식물체로 오존이 유입되면 기공의 폐쇄 및 엽육 세포 손상으로 광합성 능력을 감소시키기 때문에 (Lee et al., 2002, 2004), 오존과 식물 간의 상호작용에 대한 연구가 필요한 실정이다 (Woo et al., 2004a).

도심 녹화에 있어 원예용 초화류와 지피류의 중요성이 높아지고 있는데, 그 중 하층 피복용으로 사용되는 기린초와 비비추는 교목·관목보다 경량이며 식재와 관리가 용이하여

*Corresponding author: wsy@uos.ac.kr

※ Received 2 January 2012; Revised 24 September 2012; Accepted 26 September 2012. 이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2012R1A1A2005498).

장소에 구애 받지 않고 사용될 수 있다(Cheng et al., 2010). 또한 기린초와 비비추는 잎의 색깔, 형태 및 질감이 좋고, 꽃만 보는 식물에 비해 수명이 길며 경제적이고 다양한 경관을 연출할 수 있어 녹지공간이 절대적으로 부족한 도심에서 녹지공간 확충을 위해 많이 사용될 수 있는 식물종이다(Cheng et al., 2010).

1994년 8월 23일 서울 광화문 일대에서 경보수준의 $322\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 의 오존 농도가 측정되기도 하였으며, 서울에서만 17일 이상 주의보 수준 이상의 오존농도가 발생(Oh and Kim, 1999)하기도 하는 등 최근 도심의 오존농도는 대기환경기준을 초과하고 있으며, 장기적으로도 증가추세를 보이고 있다(Kim, 2011). 오존 피해에 대한 기존의 연구는 도심의 가로수종을 포함한 교목류를 중심으로 많이 이루어져 있다(Lee et al., 2004; Pääkkönen, 1998; Woo et al., 2004a, 2004b, 2004c). 옥상이나 벽면 등의 인공지반 녹화 및 교목류와 함께 가로변의 하층 피복용으로 사용되는 지피식물의 오존에 대한 연구는 앞으로 많이 요구된다. 따라서, 본 연구에서는 도심의 지피식물로 많이 사용되는 기린초, 비비추를 대상으로 오존에 노출된 식물의 생리적 피해 및 식물종간의 반응 특성을 비교하였다. 또한, 오존 노출에 따른 각 식물 종의 생리·생화학적 특성을 알아보고 대기환경의 오염원 중 오존 스트레스를 극복하는 식물종 연구를 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 연구는 옥상녹화나 인공지반에 적합한 수종으로 알려진(Lee et al., 2007) 기린초(*Sedum kamtschaticum*)와 비비추(*Hosta longipes*)를 대상으로 수행되었다. 식물은 경기도 고양시 지피식물원에서 2인치 포트 크기의 삽목묘를 수집하였고, 원예용 상토를 채운 직경 10cm 화분에 이식하여 온실에서 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

오존 가스 처리

지상부가 20cm 정도 되도록 생육시킨 식물체를 온도가 주간 23-25°C, 야간 18-20°C, 상대습도 70-80%로 동일하게 유지되는 두 대의 밀폐된 자연광 노출상(fumigation chamber) (150 × 150 × 200cm)으로 옮기고, 다시 7일간 노출상에서 순화시킨 후 오존 가스를 처리하였다. 오존 가스처리는 오존 발생기(DX100, Daqstation, Japan)를 통해 발생된 오존을 실험구의 노출상 안으로 유입시켰으며, 다른 노출상에는 대기(ambient air)만을 순환시켜 대조구로 사용하였다. 오존 농도의 모니터링은 화학발광식 오존 자동측정기를 이용하여 7월 12일부터

8월 8일까지 하루 8시간(08:00-16:00) 가시피해가 나타나는 시점까지 오존 가스 $200\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 을 처리하였다.

우리나라 대기환경보전법 제7조의 2(대기오염경보) 규정에 의한 “오존오염경보 및 예보제”에 의하면 오존농도가 $120\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 이상일 때 주의보, $300\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 이상일 때 경보, $500\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 이상일 때 중대경보를 내리는 등 오존농도에 따라서 3단계로 발령된다. 도심의 오존주의보와 경보의 횟수가 증가하고 있기 때문에 오존 처리 기준을 현재 오존의 1시간 평균 환경기준인 $100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 을 기준(Lee et al., 2002)으로 두 배인 오존 가스 $200\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 을 정하였다.

수분이용효율(Water Use Efficiency, WUE)

수분이용효율은 휴대용 광합성측정기(LI-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, USA)를 사용하여 오후 2시, 오후 8시, 오전 2시 오전 8시에 각각 측정하였고, 측정 시 챔버(leaf chamber)의 내부 온도는 22°C, CO₂ 농도는 CO₂ injector system을 이용하여 $400\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 로 유지하였다(Woo et al., 2004a). 줄기 끝에서 3-4번 잎을 3회씩 측정하여 평균치를 이용하였고, 측정된 Pn과 Tr 값을 이용하여 아래 식(1)과 같이 구하였다(Al-Amoudi et al., 2002).

$$WUE = Pn / Tr \quad (1)$$

여기서, WUE: water use efficiency ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{H}_2\text{O}$), Pn: photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Tr: transpiration rate ($\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 이다.

엽록소와 카로티노이드 함량(Chlorophyll and Carotenoid Contents)

엽록소[엽록소 a, 엽록소 b, 엽록소 a/b, 그리고 총 엽록소 함량 (a + b)]와 카로티노이드(carotenoid) 함량을 분석하기 위해 잎 0.1g을 아세톤(80%) 8mL에 넣고 냉암소에서 7일간 침출시킨 후 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 UV/VIS spectrophotometer(UV-2100, Shimadzu, Japan)를 이용하여 파장 663, 645, 470nm에서 측정하였으며, 엽록소 함량은 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW를 기준으로 하여 아래 식(2)과 같이 구하였다(Arnon, 1949; Lichtenthaler, 1987).

$$\begin{aligned} \text{Chlorophyll } a &= 12.7 A_{663} - 2.69 A_{645} \\ \text{Chlorophyll } b &= 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663} \\ \text{Total chlorophyll } (a + b) &= 20.29 A_{645} + 8.02 A_{663} \\ \text{Total carotenoid} &= (1,000 A_{470} - 1.82 \text{ chl. } a - 85.02 \text{ chl. } b) \\ & / 198 \end{aligned} \quad (2)$$

활성산소종의 염색 (Reactive Oxidative Species Staining)

오존처리 후 황화와 백화현상 등의 피해가 나타나는 시점을 기준으로 오존처리를 종료하였으며 비비추는 7일, 기린초는 28일 후 가시피해를 확인하였다(Fig. 1). 활성산소종의 염색을 위해 각 식물의 잎을 오존처리 후 즉시 채취하여 실험에 사용하였다.

활성산소(Superoxide Radical, O_2^-)의 NBT(Nitro Blue Tetrazolium) 염색

오존처리 후 각 식물의 잎을 채취하여 엽병 부위를 제거한 후 NBT 반응액(H_2O_2 1mL을 1/10로 희석한 용액에 NBT tablet을 넣은 용액)에 넣고 흡수가 용이하도록 15분간 진공상태에 두었다. 암소에 시료를 3-4시간 배양한 후 용액을 버리고 alcohol:lacto phenol[불포화 페놀($55^\circ C$)과 lactic acid를 1:1로 혼합한 용액]의 비율을 2:1로 한 반응액에 침투시킨 후 microwave에서 10-20초간 반응시켰다. 50% EtOH에서 두 번 세척한 후 엽록소 제거를 위해 50% EtOH에 침지시켜 냉장보관 후 현미경으로 관찰하였다(Wohlgemuth et al., 2002).

과산화수소(Hydrogen Peroxide, H_2O_2)의 DAB(Diaminobenzidine) 염색

오존 처리 후 각 식물의 잎을 채취하여 엽병 부위를 제거한 후 0.1% DAB 반응액[DMSO 1mL의 1/100 용액에 10mM MES(pH5.6) 100mg(3, 3'-diaminobenzidine)을 넣은 용액]에 넣고 15분간 진공상태를 만들어 주었다. 밝은 빛에서 시료를 30분간 배양한 후, 용액을 버리고 alcohol:lacto phenol[불포화 페놀($55^\circ C$)과 lactic acid의 비율을 1:1로 혼합한 용액]의 비율이 2:1인 반응액에 침투시킨 후 microwave에서 10-20초간 반응시켰다. 50% EtOH로 두 번 세척한 후 50% EtOH에 침투시켜 냉장 보관하였다가 현미경으로 관찰하였다(Wohlgemuth et al., 2002).

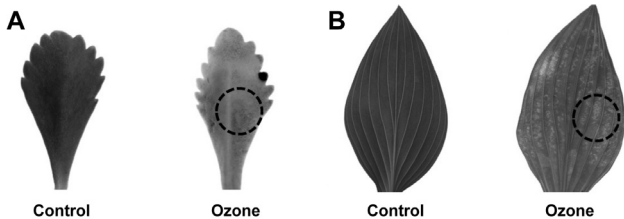


Fig. 1. Visible symptoms in (A) *Sedum kamtschaticum* and (B) *Hosta longipes* exposed to ambient air (left) or $200 \mu g \cdot kg^{-1}$ ozone (right) for 28 or 7 days respectively. Circles indicate injury of leaves.

결과 및 고찰

수분이용효율

증산속도에 대한 광합성의 비율로 산출한 수분이용효율을 오존처리된 기린초와 비비추에서 조사한 결과, 오존을 처리한 기린초의 경우 오후 2시에 대조구에 비해 현저히 감소되고, 야간 시간에는 대조구와 유사한 경향을 나타내다가 오전 8시에는 대조구에 비해 높은 경향을 보였다(Fig. 2A). 오후 2시에 오존 처리구의 수분이용효율이 현저히 감소하는 것은 낮 시간 동안 식물체의 기공을 통한 오존 유입으로 인해 증산속도가 증가되어 수분이용효율을 감소시켰으나, 오전 8시에 수분이용효율이 증가된 것은 증산율의 변화가 없이 광합성률이 증가되었기 때문으로 생각된다.

비비추의 경우 시간이 경과함에 따라 수분이용효율의 변화가 다양하게 나타났으며, 시간 경과에 따라 큰 차이를 보였다(Fig. 2B). 오존처리 후의 비비추는 오후 2시의 수분이용효율이 감소하였는데 이는 증산속도가 증가하여 수분이용효율의 저하를 가져온 것으로 보이며 이는 기린초와 마찬가지로 오존의 유입으로 인한 현상으로 보인다. 또한 비비추는 기린초와는 다르게 오전 2시에 일시적으로 수분이용효

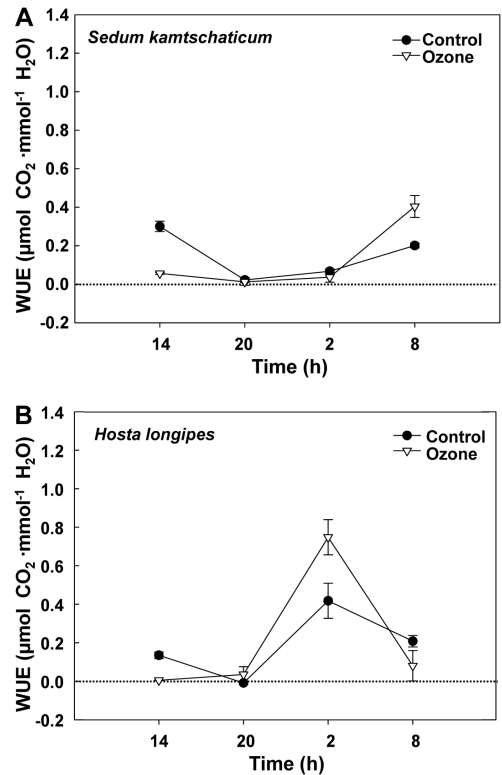


Fig. 2. Water use efficiency (WUE) of (A) *Sedum kamtschaticum* and (B) *Hosta longipes* exposed to ambient air (control) or $200 \mu g \cdot kg^{-1}$ ozone for 28 or 7 days respectively. Bars represent standard error (n = 3).

율이 증가한 결과를 나타냈으며 오존처리구에서 가장 높은 수분이용효율을 보였다.

수분이용효율은 단위 엽면적(m^2) 당 수분소비량에 대한 CO_2 의 흡수량의 비율(Han et al., 2005)을 뜻하는 말로 증산율과 광합성률의 비율로 나타낼 수 있다. 일반적으로 식물은 기공을 통해 CO_2 흡수와 H_2O 방출이 동시에 일어나며, 이때 식물 자체는 CO_2 를 더 많이 흡수하려고 하고 H_2O 를 더 적게 소비하려 하는 특성이 있다. 이러한 기공의 최적 메커니즘은 증산속도를 최소화하고 광합성속도를 최대화하여 식물의 수분이용효율을 최대로 높이는 것이다(Han et al., 2005). 이러한 결과는 오존의 유입으로 인해 식물체가 부분적으로 기공을 닫아 광합성 속도보다 증산 속도를 더 많이 감소시키고, 광합성에서 탄소를 얻는 것보다 수분손실을 감소시켜 수분이용효율이 증가(Je et al., 2006; Oh et al., 2005)한 것으로 보인다. 또한 Lim et al.(2006)의 연구에서는 식물이 대기오염 피해를 받게 되면 기공이 닫혀 일반적으로 증산량이 낮아지게 되며 이로 인해 일시적으로 수분이용효율이 증가하는 현상을 보일 수 있다고 하였다. 잎의 수분이용효율의 크기는 순광합성 속도의 크기에 정비례하기 때문에(Kozlowski and Pallardy, 1997; Han et al., 2005), 이러한 오존에 의한 수분이용효율의 급격한 변화는 일시적으로 수분이용효율이 높은 것처럼 보이지만 장기적으로는 광합성율의 변화로 인해 식물의 생리장애를 가져올 수 있으며 이러한 현상은 스트레스 피해를 받은 식물들에서 나타난다(Binkley et al., 1994; Blank et al., 1990; Lim et al., 2006).

엽록소와 카로티노이드 함량

오존처리에 따른 기린초와 비비추의 엽록소와 카로티노이드 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 엽록소 *a*, 엽록소 *b*, 총 엽록소 함량(*a + b*), 엽록소 비(*a/b*), 그리고 카로티노이드(carotenoid)의 함량 변화를 조사하였다. 그 결과, 기린초의 경우 오존처리에 따라 엽록소 *a* 함량이 대조구에 비해 55.2% 정도 감소되었고, 엽록소 *b* 함량도 대조구에 비해

19.4% 정도 감소되는 것으로 나타났다. 또한, 엽록소 비(*a/b*) 역시 기린초의 오존처리구에서 약 34.8% 감소하였다. 비비추의 경우 오존처리구에서 엽록소 *a* 함량이 대조구에 비해 86.7% 정도로 감소되는 경향을 보였으며, 엽록소 *b* 함량도 대조구에 비해 11.2% 정도로 감소되었다(Table 1). 비비추에서의 엽록소 비(*a/b*) 역시 오존처리구에서는 83.2% 감소(Hikosaka and Terashima, 1995)되었다. 총 엽록소 함량(*a + b*) 역시 감소되어(Woo et al., 2004a), 각각 오존처리구에서 기린초는 34.8% 감소, 비비추는 63.3%가 감소되는 결과를 나타내어 오존처리에 따른 식물의 엽록소 함량 변화를 확인 할 수 있었다.

식물체의 엽록소는 광합성을 함에 있어 빛 에너지를 일차적으로 수확하는 색소로서 그 함량은 식물의 광합성능력을 나타내는 지표가 된다(Woo et al., 2004a). 식물은 대기오염 같은 스트레스를 받으면 엽록소가 파괴되어 잎에 노란 반점이 나타나는 황화나 하얗게 탈색이 되는 백화현상이 많이 나타난다(Woo et al., 2004a). 특히, 엽록소 비(*a/b*)는 노화와 스트레스의 지표가 되는 것으로(Kim et al., 2003), 스트레스 환경에서 성장한 식물은 엽록소 *a*의 감소로 엽록소 *a/b*의 비율이 낮게 나타나는데(Hikosaka and Terashima, 1995; Kim et al., 2003), 이것 또한 다양한 연구결과를 통해 식물의 엽록소 함량을 감소시킨다는 보고와 일치하는 현상(Pleijel et al., 2006; Woo et al., 2004a)이었다. 또한, 식물의 광합성능력의 저하를 가져오게 되는데 특히 오존은 기공을 통해 유입된 이후 다양한 종류의 활성산소종을 발생시키는 것으로 알려져 있어 대기오염에 대한 식물피해의 척도로서 엽록소 함량이 유용한 지표가 될 수 있어 대기오염과 엽록소 함량과의 관계 연구는 많은 수종에서 이루어 지고 있다(Knudson et al., 1977; Lee et al., 2005; Mikkelsen and Heide-Jørgensen, 1996).

엽록소의 들뜬 상태가 공명전달이나 광화학반응에 의해 소광되지 않는다면 그것은 분자생태의 산소와 반응하여 단일항 산소(singlet oxygen, O_2)라고 알려진 들뜬 상태의 산소

Table 1. Chlorophyll and carotenoid contents of *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* exposed to ambient air (control) or $200\mu g \cdot kg^{-1}$ ozone for 28 or 7 days respectively.

Plant species	Treatment	Chl. <i>a</i> ($mg \cdot g^{-1}$ FW)	Chl. <i>b</i> ($mg \cdot g^{-1}$ FW)	Total Chl. ($mg \cdot g^{-1}$ FW)	Chl. <i>a</i> / Chl. <i>b</i>	Carotenoid ($mg \cdot g^{-1}$ FW)
<i>Sedum kamtschaticum</i>	Control	3.055	2.559	5.628	1.189	0.862
	Ozone	1.369 ^z	2.063 ^{**}	3.442 ^{**}	0.658 ^{**}	0.543 ^{**}
<i>Hosta longipes</i>	Control	17.901	8.034	25.989	2.227	4.043
	Ozone	2.374 ^{**}	7.135 [*]	9.539 ^{**}	0.377 ^{**}	4.029 [*]

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test $P = 0.05$.

^{*}Significant at $P = 0.05$ or 0.01, respectively.

를 형성하고 이것은 지질과 반응하여 상해를 입히는데 이때, 카로티노이드는 엽록소의 들뜬 상태를 신속하게 소멸시켜 광보호 작용을 수행한다(Lincoln and Eduardo, 2006). 식물은 오존처리에 의해 산화적 스트레스를 받으면 활성산소의 생성으로 카로티노이드의 함량이 감소(Madhoolika et al., 1982)된다. 이에 따라 카로티노이드 함량을 측정한 결과 (Table 1), 본 실험에서 카로티노이드의 함량은 기린초의 오존처리구가 약 37% 정도 감소되었으며, 비비추의 오존처리구에서는 0.35% 정도 감소되었다(Table 1). 카로티노이드는 막에 결합해 있는 대표적인 항산화제로 노화나 스트레스를 추적할 수 있는 광합성 보조 색소이다(Kim and Lee, 2005). 카로티노이드 계열의 색소들은 그 자체로 광계의 보조색소 및 구조적 기능을 가지면서 동시에 활성산소로부터 광합성 기구가 손상되는 것을 막아주는 역할(Kim and Lee, 2005)을 한다. 따라서 기린초 및 비비추의 카로티노이드의 함량이 오존처리로 인해 감소된 것으로 보인다.

활성산소종의 염색

활성산소의 NBT 염색: NBT를 이용하여 염색한 결과 기린초와 비비추에서 오존처리에 의해 superoxide의 축적이 유도된다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 기린초는 엽맥을 따라 검붉은 색으로 활성산소종이 염색되어 나타났고(Fig. 3D), 비비추의 경우 진한 노란 빛의 O_2^- 가 염색되어 엽맥을 따라 나타났다(Fig. 3H). NBT 염색 후 활성산소종은 기린초와 비비추에서 서로 다른 색으로 나타났고 활성산소(O_2^-)의 발생 부위는 기린초와 비비추 모두 엽맥을 따라 나타났다. 이는 오존에 대한 식물의 반응은 내성과 해독능력에 따라 종마다 매우 다르게 조절되기 때문(Lee et al., 2004)에 발생 부위와 색의 차이가 있는 것으로 보여진다.

식물을 포함한 대부분의 생물은 각종 환경스트레스를 받으면, 생체 내 산소가 전자와 반응하면서 hydroxyl radical($\cdot OH$), superoxide anion($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide(H_2O_2), singlet oxygen(1O_2) 등 반응성 높은 독성의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변환한다(Allan and Fluhr, 1997). 오존은 세포에서 다수의 생물학적 성분의 산화를 이끌 수 있는 높은 반응성 분자로서 오존에 노출은 감수성 식물의 잎에 산화적인 파열을 촉진시켜 스트레스를 유발하게 되며 스트레스에 의한 활성산소(superoxide radical, O_2^-)의 축적은 NBT 염색으로 나타낼 수 있다(Wohlgemuth et al., 2002).

과산화수소의 DAB 염색: 오존은 여러 가지 산화적 스트레스로 인해 식물세포에서 이차적으로 생성되는 superoxide와 더불어 과산화수소(H_2O_2)와 하이드록시 라디칼($\cdot OH$) 등과

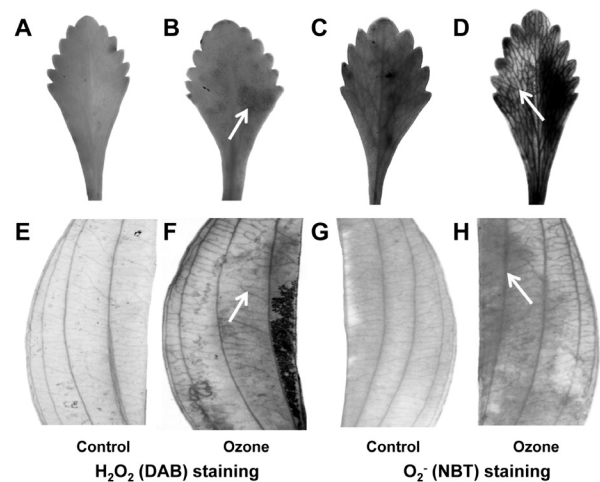


Fig. 3. Hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide radical (O_2^-) accumulation were assayed by DAB (diaminobenzidine) and NBT (nitro blue tetrazolium) staining, respectively, in (A-D) *Sedum kamtschaticum* and (E-H) *Hosta longipes* exposed to ambient air (control) or $200 \mu g \cdot kg^{-1}$ ozone for 28 or 7 days respectively. Arrows indicate spots of H_2O_2 and O_2^- accumulation.

같은 활성산소 종을 유도할 수 있다. 이러한 활성산소종 등의 독성은 식물체내에 존재하는 항산화제 사이의 연결된 네트워크로 적절하게 제거되며, 그렇지 않으면 식물체의 과민성(hypersensitive) 반응이 개시되어 세포가 죽는 원인이 된다(Kang, 2008).

APX(ascorbate peroxidase)에 의한 보호를 받지 못하는 광계2의 경우 과산화수소(H_2O_2)의 축적에 의해 심각한 손상을 받을 수 있다(Kim and Lee, 2005). 오존에 처리된 잎에서 과산화수소(H_2O_2)가 축적이 되면 세포 죽음과 가시적인 피해를 초래하고(Langebartels et al., 2002; Schraudner et al., 1998), 이와 같은 잎의 가시적 피해는 엽맥 주위에서 우선적으로 발생된다(Schraudner et al., 1998)고 보고되었다.

DAB를 이용한 과산화수소(H_2O_2)의 염색 결과, 기린초에서는 H_2O_2 의 염색이 가시피해 부위인 잎 표면에 흑갈색으로 나타났다(Shi et al., 2007)(Fig. 3B). 비비추의 경우 잎 표면뿐 아니라 엽맥 주위에도 붉은 반점의 형태로 H_2O_2 가 염색되어 나타났다(Yaeno et al., 2004)(Fig. 3F). 과산화수소(H_2O_2)의 축적은 DAB 염색(Fig. 3)으로 평가할 수 있고, 잎의 DAB 염색을 통해 책상조직에서 과산화수소의 축적을 확인할 수 있다(Wohlgemuth et al., 2002). 과산화수소의 DAB 염색 후 결과 역시 NBT 염색 결과와 마찬가지로 기린초와 비비추에서 서로 다른 색으로 나타나 식물종마다 차이가 있는 것으로 보인다(Lee et al., 2004). 하지만 잎에 DAB가 염색된 부분은 기린초와 비비추 모두 가시피해 부위인 잎 표면에서 나타나 Schraudner et al.(1998)의 연구와도 일치하는 결과를 보여주었다. 반면, NBT로 염색된 부분인 엽

맥과는 차이를 보여 식물체 부위별로 축적되는 활성산소종의 형태가 다르다는 것을 보여주었다.

식물체 내에서 발생하는 과산화수소(H_2O_2)와 superoxide radical(O_2^-) 등 활성산소종의 축적은 잎의 세포 파괴를 유도하고(Byvoet et al., 1995), 지질과산화, 세포막 분해, 단백질 분해, DNA 활성 억제, 광합성 억제, 엽록체 파괴, 노화촉진 등 생체 내에서 생리적 장애를 주며 심할 경우 세포사멸을 초래한다(Inzé and Montagu, 1995). 기린초와 비비추도 오존에 장기간 노출이 된다면 활성산소종의 생성이 가속화되고 축적의 범위가 증가하여 생리장애를 발생시킬 수 있을 것이다. 본 연구에서는 기린초와 비비추를 이용하여 오존에 대한 식물의 피해현상을 확인할 수 있었다. 오존을 처리한 실험구의 수분이용효율 변화와 엽록소 및 카로티노이드 함량의 감소가 나타났고, 식물 스트레스 인자로 오존이 작용한 것으로 보인다. 더불어 기린초와 비비추에서 스트레스로 생성된 활성산소종(H_2O_2 , O_2^-)의 염색이 확인된 것으로 보아 발생한 활성산소를 식물체가 소거하려는 현상으로 이해할 수 있다.

이상의 결과를 종합하면 오존은 기린초와 비비추에 있어 스트레스를 유발하여 식물 생육에 영향을 끼치는 인자이며, 대기 중 오존이 높은 농도인 환경에서 비비추보다는 기린초가 생육이 양호한 것으로 보여 오염원이 많은 도심 환경에 이용하기에 어느 정도 적합할 것으로 생각된다. 반면, 비비추는 오존에 민감하게 반응한 초종으로서 오존에 장기간 노출 시 기린초에 비하여 급격한 생육저하를 초래할 수 있을 것이다. 하지만 오존에 반응이 빠른 초종인 비비추의 생육 변화를 관찰한다면 대기오염원 중 오존에 대한 지표식물로도 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

초 록

본 연구에서는 오존에 대한 다년생 지피식물의 내성과 피해 특징을 알아보려고 하였다. 이를 위해 도심 녹화 수종으로 많이 이용되는 지피식물인 기린초(*Sedum kamtschaticum*)와 비비추(*Hosta longipes*)를 대상으로 환경조절형 자연광 노출상에서 $200\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 의 오존을 하루 8시간씩(오전 8시-오후 4시) 처리하였다. 초종간 피해 정도는 생리활성 분석[수분이용효율(water use efficiency), 엽록소(chlorophyll) 및 카로티노이드(carotenoid) 함량]과 활성산소종 발생분석을 통해 조사하였다. 오존처리는 기린초와 비비추 모두에서 낮 동안의 수분이용효율을 현저하게 감소시키는 것으로 조사되었다. 엽록소 함량과 카로티노이드 함량 역시 두 수종 모두 오존처리에 따라 감소되었으며, hydrogen peroxide(H_2O_2)와 superoxide radical(O_2^-)과 같은 활성산소종의 축적이 확인되

었다. 이와 같은 결과들을 토대로 기린초가 비비추에 비해 대기 중 오존에 대한 저항성이 높은 것으로 보이며, 오존에 대한 반응이 빠른 초종인 비비추의 경우 대기 중 오존 농도 증가에 대한 지표식물로도 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

추가 주요어: 과산화수소(H_2O_2), 활성산소(O_2^-), 수분이용효율(WUE)

인용문헌

- Allan, A.C. and R. Fluhr. 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9:1559-1572.
- Al-Amoudi, A., J. Dubochet, and D. Studer. 2002. Amorphous solid water produced by cryosectioning of crystalline ice at 113K. *J. Microsc.* 207:146-153.
- Aron, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Ashmore, M.R. 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell Environ.* 28:949-964.
- Binkley, D., Y.W. Son, and Z.S. Kim. 1994. Impacts of air pollution on forests: A summary of current situations. *J. Kor. For. Soc.* 83:229-238.
- Blank, L.W., H.D. Payer, T. Pfirmann, and K.E. Rehfuss. 1990. Effects of ozone, acid mist and soil characteristics on clonal Norway spruce-overall results and conclusions of the joint 14 month tree exposure experiment in closed chambers. *Environ. Pollut.* 64:385-395.
- Byvoet, P., J.U. Balis, S.A. Shelley, M.R. Montgomery, and M.J. Barber. 1995. Detection of hydroxyl radicals upon interaction of ozone with aqueous media or extracellular surfactant: the role of trace iron. *Arch. Biochem. Biophys.* 38:464-469.
- Cheng, H.C., S.Y. Woo, S.H. Lee, and S.G. Back. 2010. Photosynthesis, antioxidant enzyme and anatomical difference of *Sedum kamtschaticum* and *Hosta longipes* to ozone. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:394-402.
- Han, S.S., D.S. Jeon, and J.S. Sim. 2005. Effects of light, temperature, water changes on physiological responses of *Kalopanax pictus* leaves (II). *J. For. Sci.* 21:92-97.
- Hikosaka, K. and I. Terashima. 1995. A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C3 plants to sun and shade with respect to nitrogen use. *Plant Cell Environ.* 18:605-618.
- Inzé, D. and M.V. Montagu. 1995. Oxidative stress in plants. *Plant Biotechnol.* 6:153-158.
- Je, S.M., S.G. Son, S.Y. Woo, K.O. Byun, and C.S. Kim. 2006. Photosynthesis and chlorophyll contents of *Chloranthus glaber* under different shading treatments. *Kor. J. Agr. For. Meteorol.* 8:54-60.
- Kang, S.J. 2008. Response on monodehydroascorbate reductase (MDHAR) in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaves subjected to water deficit stress. *J. Bio. Environ. Cont.* 17:273-282.
- Kim, J.H. and C.H. Lee. 2005. In vivo deleterious effects

- specific to reactive oxygen species on photosystem I and II after photo-oxidative treatments of rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Plant Sci.* 168:1115-1125.
- Kim, P.G., K.Y. Lee, S.D. Hur, S.H. Kim, and E.J. Lee. 2003. Effects of shading treatment on photosynthetic activity of *Acanthopanax senticosus*. *Kor. J. Ecol.* 26:321-326.
- Kim, S.T. 2011. Estimating ozone sensitivity coefficients to NO_x and VOC emissions using BFM and HDDM for a 2007 June episode. *J. Environ. Sci.* 20:1465-1481.
- Kim, Y.R., I.H. Yoon, and H.J. Kim. 2001. Synoptic weather patterns and variation of ozone concentrations association with high ozone days at five major cities in Korea. *J. Kor. Environ. Sci. Soc.* 10:437-444.
- Kozlowski, T.T. and S.G. Pallardy. 1997. *Physiology of woody plants*. Academic Press, New York.
- Knudson, L.L., T.W. Tibbitts, and G.E. Edwards. 1977. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. *Plant Physiol.* 60:606-608.
- Langebartels, C., H. Wohlgemuth, S. Kschieschan, S. Grün, and H. Sandermann. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol. Biochem.* 40:567-575.
- Lee, E.H., E.J. Cho, M.Y. Park, D.W. Kim, and S.W. Jang. 2007. Selecting plants for the extensive rooftop greening based on herbal plants. *J. Kor. Environ. Res. Reveg. Tech.* 10:84-96.
- 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, S.S. Jang, H.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, 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 SO₂. *Kor. J. Agr. For. Meteorol.* 5:18-23.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350-382.
- Lincoln, T. and Z. Eduardo. 2006. *Plant physiology*. 4th ed. Life Science Publishing Co., USA.
- Lim, J.H., S.Y. Woo, M.J. Kwon, J.H. Chun, and J.H. Shin. 2006. Photosynthetic capacity and water use efficiency under different temperature regimes on healthy and declining Korean fire in Mt. Halla. *J. Kor. For. Soc.* 95:705-710.
- Madhoolika, A., P.K. Nandi, and D.N. Rao. 1982. Effect of ozone and sulphur dioxide pollutants separately and in mixture on chlorophyll and carotenoid pigments of *Oryza sativa*. *Water Air Soil Pollution* 18:449-454.
- 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.
- Oh, C.Y., S.H. Han, Y.Y. Kim, and J.C. Lee. 2005. Change of drought tolerance and photosynthetic characteristics of *Populus davidiana* dode according to PEG concentration. *Kor. J. Agr. For. Meteorol.* 7:296-302.
- Oh, H.S. and Y.S. Kim. 1999. Characteristics of surface and synoptic meteorology during high-ozone episodes in the greater Seoul area. *J. Kor. Soc. Atmos. Environ.* 15:441-455.
- 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., M.S. Günthardt-Goerg, and T. Holopainen. 1998. Responses of leaf processes in a sensitive birch (*Betula pendula* Roth) clone to ozone combined with drought. *Ann. Bot.* 82:49-59.
- Pleijel, H., A. Berglen Eriksen, H. Danielsson, N. Bondesson, and G. Sellén. 2006. Differential ozone sensitivity in an old and a modern Swedish wheat cultivar-grain yield and quality, leaf chlorophyll and stomatal conductance. *Environ. Expt. Bot.* 56:63-71.
- Saitanis, C.J., A.N. Riga-Karandinos, and M.G. Karandinos. 2001. Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Chemosphere* 42:945-953.
- 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. *Plant J.* 16:235-245.
- Shi, L., J. Bielawski, J. Mu, H. Dong, C. Teng, J. Zhang, X. Yang, N. Tomishige, K. Hanada, Y. Hannun, and J. Zuo. 2007. Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 17:1030-1040.
- Wohlgemuth, H., K. Mittelstrass, S. Kschieschan, J. Bender, H. J. Weogel, K. Overmyer, J. Kangasjarvi, H. Sandermann, and C. Langebartels. 2002. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environ.* 25:717-726.
- 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.
- Yaeno, T., O. Matsuda, and K. Iba. 2004. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J.* 40:931-941.