

## 두릅나무과 식물의 SOD 활성과 광계 II의 광화학적 효율에 미치는 온도 스트레스와 Paraquat의 영향

오순자 · 고정균 · 김응식<sup>1</sup> · 오문유 · 고석찬

(제주대학교 생물학과, <sup>1</sup>서남대학교 생물학과)

**적 요** - 여름철 자연조건에서 자라는 두릅나무과 식물 잎의 SOD 활성과 광계 II의 광화학적 효율의 차이를 분석하고 온도 스트레스와 paraquat의 영향을 조사하였다. 그 결과, 두릅나무과 식물 6종의 잎으로부터 총 8개의 superoxide dismutase (SOD) isoenzyme이 구분되었다. 그 중, 섬오갈피나무 (*Acanthopanax koreanum*)에서는 두릅나무과 식물에 공통적인 2개의 isoenzyme (SOD 4와 SOD 6)이 높은 활성으로 검출되었고, 황칠나무 (*Dendropanax morbifera*)에서는 두릅나무과 식물이 갖는 8개의 isoenzyme이 모두 검출되었다. 광계 II의 광화학적 효율을 나타내는 Fv/Fm은 낙엽성 식물에서는 섬오갈피나무가 다른 종보다 높았으며, 상록성 식물에서는 음지에 위치해 있는 잎이 양지에 위치해 있는 잎보다 전반적으로 높게 나타났다. 섬오갈피나무 잎 disc의 Fv/Fm은 온도가 높아짐에 따라 감소하였지만 황칠나무 잎 disc에서는 35°C에서 현저하게 감소하였다. 그리고 온도 스트레스와 함께 paraquat를 처리하였을 때 섬오갈피나무에서는 4°C에서, 황칠나무에서는 35°C에서 Fv/Fm이 억제되었다. 한편, SOD 활성은 섬오갈피나무 잎 disc에서는 4°C와 28°C에서 높았고 paraquat를 함께 처리하였을 때에는 모든 온도에서 활성이 높아졌다. 그러나, 황칠나무 잎 disc에서는 온도가 높아짐에 따라 SOD 활성이 억제되었고 paraquat를 함께 처리하였을 때에는 더욱 억제되었다. 따라서, 섬오갈피나무는 황칠나무에 비하여 온도 스트레스나 산화적 스트레스에 효율적으로 대처하는 것으로 나타났다.

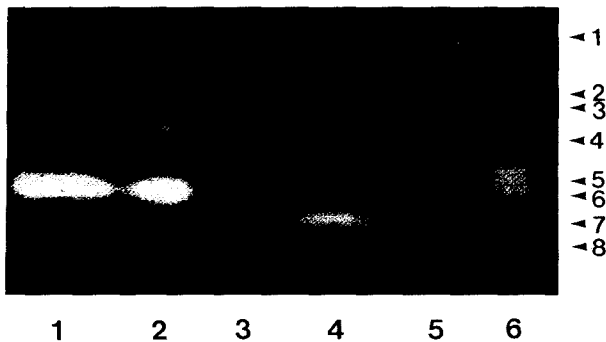
### 서 론

식물은 세균이나 곰팡이, 곤충 등에 의한 생물학적 스트레스 뿐만 아니라, 제초제나 살충제 등의 농약, 아황산가스나 오존 등의 대기 오염물질, 그리고 수분과 온도 등 비생물학적 스트레스들을 끊임없이 받고 있다.

식물 중에 따라 다르지만 이러한 환경 스트레스에 의해 superoxide anion radical ( $\cdot O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxy radical ( $\cdot OH$ ) 등 활성산소의 양이 증가한다(Allen 1995). 이들 활성산소들은 강한 산화력을 가지고 있어 세포막 분해, 단백질 분해, DNA 합성 억제, 광합성 억제 등 심각한 생리적인 장애를 유발하여 식물의 생산성을 저해하거나 심하면 식물을 죽게 한다(Packer *et al.* 1993). 하지만, 식물체 내에는 활성산소의 증가에 대항하는 기작들이 존재하며, 그 중 하나가 항산화효소에 의한 활성산소의 제거이다. Superoxide dismutase (SOD)는 항산화효소 중 하나로  $\cdot O_2^-$ 을  $O_2$ 와  $H_2O_2$ 로 전이시키는 반응을 촉매하여(Fridovich 1974), 여러 가

지 환경 스트레스에 의한  $\cdot O_2^-$ 의 축적을 막고 환경 스트레스에 대한 내성을 증가시킨다(Bowler *et al.* 1992). 한편, paraquat는 일종의 bipyridinium계 제초제로써 광합성 광계I의 ferredoxin과  $NADP^+$  사이의 전자전달을 가로 막아 광합성을 방해하고 산소분자를 환원시켜  $\cdot O_2^-$ 를 형성하므로써 식물체에 해로운 결과를 초래한다. Paraquat에 저항성을 보이는 종들은 감수성 식물보다 SOD와 같은 방어와 관련된 효소들의 활성이 높다는 사실이 밝혀져(Seppänen 1997), paraquat에 대한 저항성을 조사하므로써 산화적 스트레스에 내성이 강한 품종을 선발하는데 이용할 수 있다.

한편, 식물이 과도한 빛에 노출되면 빛에 의해 광합성 능력이 감소되는 광억제 현상이 일어나는데(Powles 1984), 저온이나 고온 등의 다른 환경 스트레스가 함께 작용할 경우에 더욱 심각하게 일어난다(Öquist *et al.* 1987; Ludlow 1987). 광억제 현상은 광계 II 손상의 수선율이 광피해를 보상하지 못할 때 일어나는 것으로(Tyystjärvi *et al.* 1992) 약한 광량에서도 다른 요인이 수선 메커니즘을 제한할 경우에는 광억제가 일어난다(Somersalo



**Fig. 1.** Comparison of leaf SOD isoenzyme profiles among Araliaceae plants under natural field condition in summer. 1, *Acanthopanax koreanum*; 2, *Aralia elata*; 3, *Kalopanax pictus*; 4, *Dendropanax morbifera*; 5, *Fatsia japonica*; 6, *Hedera rhombea*.

& Krause 1990). 따라서, 광계 II의 광합성 효율은 잎에 대한 많은 정보를 줄 뿐만 아니라 (Long *et al.* 1994) 여러 가지 환경 스트레스의 영향을 연구하는데 많이 이용되고 있다 (Demming & Björkman 1987).

본 연구에서는 자연조건에서 자라는 두릅나무과 식물 6종을 대상으로 SOD 활성과 광계 II의 광화학적 효율의 차이를 분석하고, 섬오갈피나무와 황칠나무 잎에 인위적으로 온도 스트레스와 paraquat를 처리하였을 때의 SOD 활성과 광계 II의 광화학적 효율의 변화를 비교하였다.

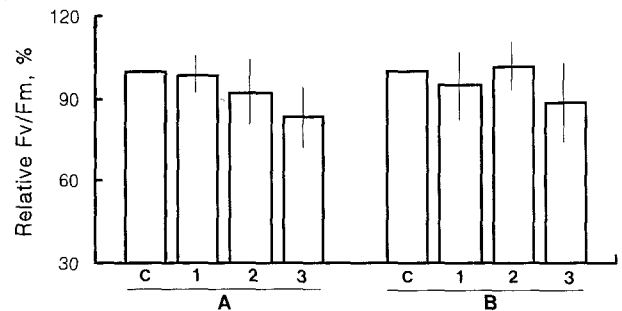
## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험재료는 자연조건에서 자라는 두릅나무과 식물 중 상록성인 것과 낙엽성인 것을 각각 3종씩 선정하여 그 잎을 사용하였다. 낙엽성 식물로는 섬오갈피나무 (*Acanthopanax koreanum*), 두릅나무 (*Aralia elata*)와 음나무 (*Kalopanax pictus*)를, 상록성 식물로는 황칠나무 (*Dendropanax morbifera*), 팔손이 (*Fatsia japonica*)와 송악 (*Hedera rhombea*)을 선정하였다.

### 2. 온도 스트레스와 paraquat의 처리

온도 스트레스는 Slooten 등 (1995)의 방법을 사용하여 처리하였다. 우선, 섬오갈피나무와 황칠나무의 성숙한 잎으로부터 지름이 1.5 cm인 잎 disc를 만들고 증류수가 들어있는 용기에 띄워 실온에서 광을 차단하고 12시간 동안 정치시켰다. 이어서 30  $\mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$ 의 빛을 2시간 처리한 후, 10시간 동안 광을 차단하여 4°C, 28°C, 35°C



**Fig. 2.** Effects of temperature on photochemical efficiency of PSII in leaf discs of *Acanthopanax koreanum* (A) and *Dendropanax morbifera* (B). C, control leaves detached freshly; leaf discs floated on DW at 4°C (1), 28°C (2) and 35°C (3).

로 온도를 달리하여 처리하였다. Paraquat는 증류수를 2  $\mu\text{M}$  paraquat로 대체하여 온도 스트레스처리와 동일한 방법으로 처리하였다.

### 3. SOD 전기영동 분석

조효소액은 성숙한 잎 또는 잎 disc를 생중량 1g씩 취하여 0.1 mM EDTA를 함유한 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.8) 2 ml와 함께 얼음 위의 유발에서 마쇄한 후, 4°C에서 8,000 g로 30분간 원심분리하여 얻은 상정액을 사용하였다.

전기영동은 Laemmli (1970)의 방법을 변형한 non-denaturing condition에서 7.5% polyacrylamide gel을 사용하여 실시하였다. 조효소액은 시료용 완충용액 (125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 0.005% bromophenol blue, 40% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol)과 동량 혼합하여 30  $\mu\text{l}$ 를 loading하였다. SOD의 분석은 전기영동이 끝난 겔을 2.45  $\times 10^{-3}$  M nitroblue tetrazolium 용액에서 20분, 염색 용액 (36 mM potassium phosphate, pH 7.8; 28 mM TEMED, 2.8  $\times 10^{-5}$  M riboflavine)에서 15분간 암상 상태에서 진탕한 후, light 하에서 5~10분 후에 나타나는 밴드를 조사하였다 (Beauchamp & Fridovich 1971).

### 4. 광계 II의 광화학적 효율의 측정

광계 II의 광화학적 효율은 Plant Efficiency Analyser (Hansatech Instrument Ltd., UK)를 이용하여 측정하였다. 즉, 성숙한 잎 중에서 엽색과 형태가 비슷한 것을 골라 10분간 광을 차단하여 암적응시킨 후 1,500  $\mu\text{mole/m}^2/\text{sec}$ 의 광량을 5초간 조사하여 Fv/Fm, Fm, Fo 등을 측정하였다.

**Table 1.** Comparison of leaf chlorophyll fluorescence among Araliaceae plants under natural field condition in summer

Plant Species	Leaf Condition	Fluorescence Intensity (Arbitrary Units)		
		Fo	Fm	Fv/Fm
<i>Acanthopanax koreanum</i> <sup>(1)</sup>	EL	539 ± 26.3	3115 ± 165.9	0.83 ± 0.001
<i>Aralia elata</i> <sup>(1)</sup>	EL	528 ± 30.6	2380 ± 138.8	0.78 ± 0.021
<i>Kalopanax pictus</i> <sup>(1)</sup>	EL	484 ± 17.7	2361 ± 154.7	0.79 ± 0.009
<i>Dendropanax morbifera</i> <sup>(2)</sup>	EL	519 ± 25.4	2037 ± 251.1	0.74 ± 0.030
	SL	545 ± 15.9	2854 ± 180.0	0.81 ± 0.015
<i>Fatsia japonica</i> <sup>(2)</sup>	EL	565 ± 23.9	2194 ± 231.2	0.74 ± 0.032
	SL	548 ± 24.1	3042 ± 197.6	0.82 ± 0.012
<i>Hedera rhombea</i> <sup>(2)</sup>	EL	546 ± 12.9	2932 ± 139.8	0.81 ± 0.006
	SL	641 ± 49.5	3124 ± 206.3	0.79 ± 0.031

<sup>(1)</sup> deciduous plants, <sup>(2)</sup> evergreen plants; EL, exposed leaf; SL, shaded leaf.

## 결과 및 고찰

### 1. 두릅나무과 식물간의 SOD isoenzyme 패턴과 광계 II의 광화학적 효율의 비교

여름철 자연조건 하에서 성장하고 있는 두릅나무과 식물 6종의 잎으로부터 SOD isoenzyme 패턴을 조사하였다(Fig. 1). 그 결과, 종에 따라 다르지만 전체적으로 8개의 밴드가 검출되었다. 이들 밴드들을 전기이동도에 따라 SOD 1에서 SOD 8로 명명하였을 때, 이들 중 2개의 isoenzyme (SOD 4와 SOD 6)은 효소활성, 즉 밴드의 강약에는 차이가 있지만, 상록성 식물과 낙엽성 식물에 관계없이 두릅나무과의 모든 식물에 공통적으로 나타났으며 섬오갈피나무와 두릅나무에서 활성이 특히 높았다. 하지만 나머지 6개의 isoenzyme의 분포는 식물 종에 따라 크게 차이가 있었는데, 낙엽성 식물인 으나무는 SOD 4~SOD 6의 패턴으로 보아 섬오갈피나무, 두릅나무와 상록성 식물인 황칠나무의 중간적인 특징을 보였으며, 상록성 식물인 팔손이와 송악은 SOD 2를 가지고 있는 점이 다르지만 각각 낙엽성 식물인 섬오갈피나무나 두릅나무, 그리고 으나무와 유사한 패턴을 나타냈다. 그리고, 상록성 식물 중 황칠나무에서는 두릅나무과 식물 전체가 가지는 isoenzyme이 모두 검출되었다. 따라서, 섬오갈피나무와 두릅나무는 비록 2개의 isoenzyme만을 가지지만 효소활성이 다른 종에 비하여 높아서 산화적 스트레스에 내성이 강할 것으로 보이고, 황칠나무는 다양한 isoenzyme을 가지므로 산화적 스트레스에 대한 대처 기구가 다양한 것으로 판단되었다.

한편, 두릅나무과 식물 6종을 대상으로 잎의 광계 II의 광화학적 효율을 측정하였다(Table 1). 그 결과, 낙엽성 식물 중에서 섬오갈피나무는 광계 II의 광화학적 효율을 나타내는 Fv/Fm이 두릅나무나 으나무보다 높았다. 그리

고, 상록성 식물 중에서 황칠나무와 팔손이의 Fv/Fm은 음엽이 양엽보다 높고 송악의 Fv/Fm은 양엽과 음엽 간에 차이가 거의 없었다. 따라서 상록성 식물의 Fv/Fm은 양엽 중에는 송악이, 음엽 중에는 황칠나무와 팔손이가 다소 높았다. 이러한 결과는 낙엽성 식물 중에서 섬오갈피나무가 두릅나무나 으나무에 비하여, 그리고 상록성 식물 중에서는 송악이 황칠나무, 팔손이에 비하여 Fm과 Fo이 큰데서 기인한 것으로 판단되었다. 하지만, 대부분의 식물에서 Fv/Fm이 0.8~0.83를 보이는 것에 비하여 (Demmig & Björkman 1987), 이들 두릅나무과 식물의 Fv/Fm은 다소 낮은 값을 보여 종에 따라 또는 식물에 처한 환경에 따라 광억제가 다르게 일어나는 것으로 보인다. 특히, 황칠나무와 팔손이에서 양엽이 음엽보다 Fv/Fm이 낮은 것은 Fm의 감소한 때문으로 나타났다.

### 2. 온도 스트레스에 의한 광계 II의 광화학적 효율의 변화

두릅나무과 식물 6종 중 섬오갈피나무와 황칠나무의 성숙한 잎을 사용하여 disc를 만들고 저온(4°C)과 고온(35°C), 그리고 여름철 상온(28°C)의 조건 하에서 일정 시간 동안 두고 광계 II의 광화학적 효율의 변화를 조사하였다(Fig. 2). 섬오갈피나무는 Fv/Fm이 온도처리 전에 비하여 4°C, 28°C, 35°C에서 각각 2%, 8%, 17% 감소하였는데 이는 온도가 높아짐에 따라 Fo가 증가하고 Fm이 감소한 결과이다. 황칠나무는 Fv/Fm이 28°C에서는 온도처리 전의 잎과 유사하였지만, 4°C에서 5%, 35°C에서 12%가 감소하였는데 이는 Fm의 감소한 때문으로 나타났다. 이로부터 섬오갈피나무와 황칠나무는 모두 4°C보다 35°C에 더 민감하고, 여름철 상온(28°C) 하에서는 황칠나무에 비하여 섬오갈피나무가 더 민감한 것으로 해석되었다. 특히, 두 종 모두 35°C에 민감한 것으로 나타난 것은 엽록체 수준에서 광합성 기구의 기능에 장애가

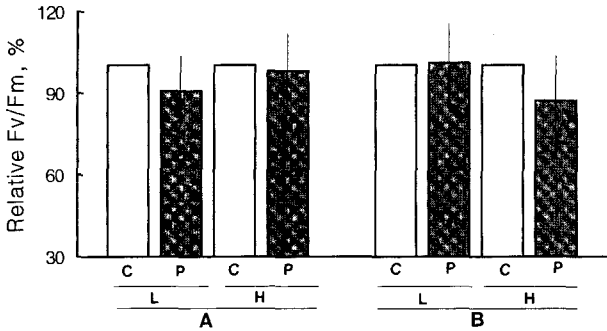


Fig. 3. Effects of paraquat on photochemical efficiency of PSII in leaf discs of *Acanthopanax koreanum* (A) and *Dendropanax morbifera* (B) under 4°C (L) and 35°C (H). C, control leaf discs floated on DW; P, leaf discs floated on 2 μM paraquat

일어나 잎의 광합성능이 저해된 때문인 것으로 보인다 (Berry & Björkman 1980).

3. 온도 스트레스 하에서 paraquat에 의한 광계 II의 광화학적 효율의 변화

섬오갈피나무와 황칠나무의 잎 disc를 저온(4°C), 고온(35°C) 그리고 여름철 상온(28°C)의 조건 하에서 paraquat를 함께 처리하여 광계 II의 광화학적 효율의 변화를 조사하였다(Fig. 3). 섬오갈피나무인 경우 4°C에서는 paraquat 처리에 의해 Fv/Fm이 현저히 낮아졌으며, 35°C에서는 paraquat 처리에 의한 Fv/Fm의 감소가 작았다. 황칠나무의 Fv/Fm은 4°C에서는 paraquat의 영향이 거의 없었으며 35°C에서는 paraquat를 함께 처리했을 때 Fv/Fm의 감소가 크게 나타났다. 그리고 28°C에서는 섬오갈피나무와 황칠나무 모두 paraquat의 영향이 없는 것으로 나타났다. 따라서, paraquat의 영향은 종에 따라서 그리고 온도에 따라서 다르게 나타나는데, 4°C에서는 황칠나무가, 35°C에서는 섬오갈피나무가 산화적 스트레스에 내성이 강한 것으로 보인다.

4. 온도 스트레스와 paraquat에 의한 SOD 활성의 변화

섬오갈피나무와 황칠나무의 잎 disc에 온도 스트레스와 paraquat를 처리하여 SOD활성의 변화를 조사하였다(Fig. 4). 그 결과, 섬오갈피나무는 온도를 달리 처리하였을 때 4°C와 28°C에서 처리 전보다 SOD 4와 SOD 6의 활성이 증가하였지만, 35°C에서는 처리 전과 차이가 없었다. 반면에 황칠나무에서는 4°C와 28°C에서는 대부분 isoenzyme이 억제되었고 35°C에서는 모든 isoenzyme이 억제되었다. 한편, 각각의 온도에서 2 μM para-

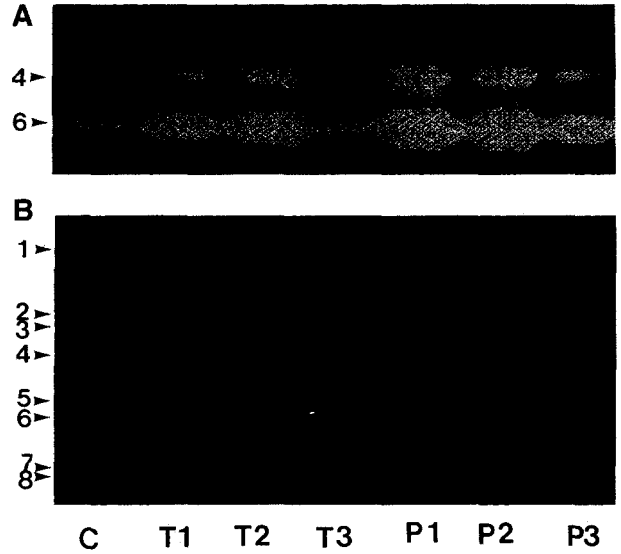


Fig. 4. Effects of temperature and paraquat on leaf SOD activities of *Acanthopanax koreanum* (A) and *Dendropanax morbifera* (B). C, control leaves detached freshly; T, leaf discs floated on DW at 4°C (1), 28°C (2) and 35°C (3); P, leaf discs floated on 2 μM paraquat at 4°C (1), 28°C (2) and 35°C (3).

quat를 처리했을 때 섬오갈피나무에서는 모든 온도에서 활성이 높아졌다. 하지만, 황칠나무에서는 2 μM paraquat를 처리했을 때에 4°C와 28°C에서는 대부분 isoenzyme이 억제되었고 35°C에서는 모든 활성이 억제되었다. 따라서, 황칠나무는 SOD 밴드가 다양하지만 활성이 낮고 온도 스트레스와 paraquat에 민감하여 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>를 효율적으로 전환하지 못하는 것으로 보인다. 반면에 섬오갈피나무는 4°C에서 paraquat를 처리했을 때 Fv/Fm가 다소 감소하지만, 자체 내의 SOD 활성이 높고 온도 스트레스나 paraquat에 의해 그 SOD 활성이 더 높아져 온도나 산화적 스트레스에 효율적으로 대처하는 것으로 해석된다.

사 사

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(기초과학 BSRI-97-4446)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* **107** : 1049-1054.  
 Beauchamp C & I Fridovich (1971) Superoxide dismutase:

- Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44** : 276–287.
- Berry J & O Björkman (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31** : 491–543.
- Bowler CM, M van Montagu & D Inz (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43** : 83–116.
- Demming B & O Björkman (1987) Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O<sub>2</sub> evolution in leaves of higher plants. *Planta* **171** : 171–184.
- Fridovich I (1974) Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.* **41** : 35–97.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680–685.
- Long SP, S Humpries & PG Falkowski (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45** : 633–662.
- Ludlow MM (1987) Light stress at high temperature. pp. 89–109. *In* Photoinhibition (Kyle DJ, CB Osmond and CJ Arntzen eds). Elsevier, Amsterdam.
- Öquist G, DH Greer & E Ögren (1987) Light stress at low temperature. pp. 67–87. *In* Photoinhibition (Kyle DJ, CB Osmond and CJ Arntzen eds). Elsevier, Amsterdam.
- Packer L & AN Glazer (1993) Oxygen radicals in biological systems: Oxygen radicals and antioxidants. Academic Press, San Diego.
- Powles SB (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35** : 15–44.
- Seppänen MM, M Majaharju, S Somersalo & E Pehu (1997) Freezing tolerance, cold acclimation and oxidative stress in potato. Paraquat tolerance is related to acclimation but is a poor indicator of freezing tolerance. *Physiol. Plant.* **102** : 454–460.
- Slooten L, K Capiou, W van Camp, M van Montagu, C Sybesma & D Ins (1995) Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol.* **107** : 737–750.
- Somersalo S & GH Krause (1990) Photoinhibition at chilling temperatures and effects of freezing stress on cold-acclimated spinach leaves in the field: a fluorescence study. *Physiol. Plant.* **79** : 617–622.
- Tyystjärvi E, K Ali-Yrkko, R Kettunen & E-M Aro (1992) Slow degradation of D1 protein is related to the susceptibility of low-light-grown pumpkin plants to photoinhibition. *Plant Physiol.* **100** : 1310–1317.

## Effects of Temperature Stress and Paraquat on SOD Activity and Photochemical Efficiency of PSII in Leaves of Araliaceae Plants

Soon Ja Oh, Jung Goon Koh, Eung Sik Kim<sup>1</sup>, Moon You Oh and Suck Chan Koh

(Department of Biology, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

<sup>1</sup>Department of Biology, Seonam University, Namwon 590-711, Korea)

**Abstract** - The effects of temperature stress and paraquat on the superoxide dismutase (SOD) activity and the photochemical efficiency of photosystem II were studied in the leaves of Araliaceae plants. The SOD activity of *Acanthopanax koreanum* leaf discs increased at 4°C and 28°C, and increased significantly at 4°C, 28°C and 35°C in the presence of paraquat. However, the SOD activity of *Dendropanax morbifera* leaf discs decreased at 4°C, 28°C and 35°C regardless of paraquat treatment. The photochemical efficiency of photosystem II, Fv/Fm, of leaf discs of *A. koreanum* and *D. morbifera* fell remarkably at 35°C. In the presence of paraquat, the Fv/Fm values fell slightly at 4°C in *A. koreanum* leaf discs and at 35°C, in *D. morbifera* leaf discs. These results indicate that *A. koreanum* plants are more resistant to temperature stress or oxidative stress than *D. morbifera* plants although their photochemical efficiency falls slightly at 4°C in the presence of paraquat. [*Acanthopanax koreanum*, *Dendropanax morbifera*, Superoxide dismutase, Chlorophyll fluorescence, Temperature stress, Paraquat].