

Metsulfuron-methyl 처리에 의한 옥수수의 Anthocyanin 축적 생리에 관한 연구

박은양* · 김진석* · 조광연* · 변종영**

Physiology of Anthocyanin Accumulation in Corn Leaves Treated with Metsulfuron-methyl

Park E.Y*, J.S. Kim*, K.Y. Cho* and J.Y. Pyon**

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the cause of anthocyanin accumulation in the corn leaves treated with metsulfuron-methyl.

The accumulation of anthocyanin and total sugar was increased with the time after metsulfuron-methyl application and with the greater herbicide concentration as well. The anthocyanin increase was alleviated by the combined treatment of DUMU or the tank-mixture treatment of metsulfuron-methyl, isoleucine and valine. Metsulfuron-methyl could not enhance the anthocyanin formation in the nonchlorophyllous tissue in which photosynthetic carbohydrate production was limited. Upon the exogenous supply of sucrose, however, the contents of anthocyanin was increased in the both chlorophyllous and nonchlorophyllous leaf segment of corn without the herbicide treatment. On the other hand, the herbicide itself did not influence Hill reaction *in vitro* and photosynthesis electron transport *in vivo*. The anthocyanin accumulation by metsulfuron-methyl did not occur in the corn mutants deficient in the structural gene of anthocyanin synthesis, but corns deficient in the regulatory gene had the anthocyanin accumulation only in R-r and r-r type. The above results suggest that the purple pigmentation in the corn leaves treated with metsulfuron-methyl is related to the accumulation of photosynthetic carbohydrate which can stimulate the regulatory gene related to anthocyanin biosynthetic pathway.

Key words : metsulfuron-methyl, anthocyanin, herbicide, acetolactate synthase(ALS) inhibitor, sucrose

* 한국화학연구소(KRICT, P.O. BOX 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea)

** 충남대학교 농과대학 농학과(College of Agriculture, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

('98. 5. 28 접수)

緒 言

제초제가 식물체의 어디를 공격하여 작용성을 나타내느냐 하는 것은 그 약제의 활성, 선택성 또는 안전성 등과 매우 밀접한 관련이 있다. 따라서 작용성을 명확히 이해한다는 것은 신규제초제의 개발로부터 합리적인 이용에 이르기까지 매우 도움이 되기 때문에 많은 노력을 투자하여 작용기작 연구를 수행하게 된다. 현재 작용기작별로 제초제를 분류하면 대략 15개 정도로 그룹지을 수 있다. 그 중에서 분지 아미노산인 valine, leucine 및 isoleucine의 생합성 과정에 작용하는 acetolactate synthase (ALS)를 저해하는 제초제들로서는 1980년대부터 개발되기 시작한 sulfonyleurea 및 imidazolinone계와 90년대에 들어서 소개된 triazolopyrimidines, sulfoanilides, pyrimidinyl thiobenzoates 등이 알려지고 있다^{25,34,39}. 이들은 낮은 약량으로 일년생 및 다년생 잡초를 광범위하게 방제할 수 있을 뿐만 아니라, 포유 독성이 매우 낮으며 여러 작물에 대해 다양한 선택성을 가지는 약제들이 많기 때문에 현재 전 세계적으로 매우 높은 시장점유율을 가지고 있는 제초제이다^{5,7,25,39}.

ALS 저해제를 식물에 처리하면 어린 뿌리와 잎의 생장이 먼저 저해되고 아울러 생장이 왕성한 잎에서 황백화 현상(chlorosis)이 나타난다. 이런 초기 증상 이후에는 분열조직에서의 불균형적인 성장으로 인한 잎의 기형화 및 자엽병 굴곡현상이 동반되면서 경엽의 탈색과 식물중에 따라 잎의 자색화가 일어나고 결국 식물체는 고사에 이르게 된다^{5,7,18,25,27}. 생장이 왕성한 조건에서는 10일 이내에 식물이 고사되기 시작하나 생장이 느리게 일어나는 조건에서는 2개월이 걸리기도 한다. 이와같은 증상을 초래시키는 ALS 저해제들의 작용기작에 관한 연구는 특히 이들의 작용점인 ALS와 화합물과의 관계에 대한 연구를 중심으로 매우 많이 진행되어 왔다. 식물에 존재하는 ALS효소의 세가지 동위효소중에 ALS isozyme II가 제초제에 가장 민감하며³¹, 제초제와 효소와의

결합양식이 규명되었고^{21,31}, 현재는 유전자조작 등을 통해 ALS 작용점을 변이시켜 저항성 작물까지 육종한 상태이다²⁴. 그러나 ALS저해 이후 식물체가 죽음에 이르기까지의 과정에 대한 이해는 매우 약하다. ALS 저해제의 살초기 작으로서 1) 분지아미노산의 생성저해로 인한 세포분열 관련 대사물질의 생성저해^{27,29}, 2) ALS 저해로 인한 유독물질의 축적²², 3) 축적된 당의 sink로의 이동저해로 인한 각종 생리작용 교란^{4,16,18,19} 등으로 제안되고 있으나 보다 자세한 것은 불명확한 상태이다. 특히 식물에 따라 잎의 자색화가 나타나는 원인에 대해서는 전혀 보고되어 있지 않다.

따라서 본 실험에서는 ALS 저해제의 살초기 작용 좀 더 이해할 목적으로 ALS 저해제들에 의해 나타나는 가장 현저한 특징중의 하나인 식물체의 자색화 현상을 조사해 보고자 하였다. 그러기 위해 ALS 저해제 처리에 의한 anthocyanin 축적의 특징을 살펴보고, anthocyanin의 축적이 당과 관계가 있는지, 있다면 어떤 방법으로 작용하는지를 알아보기 위해 제반 실험을 수행하였다.

材料 및 方法

1. 식물재료 및 화합물

식물재료로는 국립종자보관소에서 분양받은 옥수수(수원 19호)를 사용하였고, 엽록소를 함유하지 않은 백화 옥수수는 50ppm의 플루리돈 수용액에 정상옥수수 종자를 24시간동안 침지한 것으로부터 얻었다. Anthocyanin 생성단계의 유전자가 부분적으로 결손되어 있는 옥수수 변이주들은 충남대 원예학과에서 분양 받은 것으로서 구조유전자에 이상이 있는 YP445, YP449, YP454, YP458, YP461, YP473와 조절유전자에 이상이 있는 YP810 YP813, YP814를 사용하였다.

사용한 화합물 중 metsulfuron-methyl(a.i. 97%)는 한국화학연구소 제초제 합성실구실로부터 분양받았고, DCMU(diuron, a.i. 80%), isoleucine (ILE), valine(VAL), anthrone 등은 Sigma사로부터

터 구입하여 사용하였다.

2. Anthocyanin과 당함량 조사를 위한 제반 처리

Metsulfuron-methyl 처리에 의한 anthocyanin 함량 변화를 조사하기 위해 옥수수 종자를 350cm² 포트에서 5립씩 5줄을 심어 온실 조건(낮/밤의 평균온도가 30/20℃이며, 광도가 약 460μmol/m²/sec인 조건)에 두었다. 제 3엽이 전개되는 초기에 일정 개체를 선별하여 metsulfuron-methyl을 1.25, 2.5, 5.0g/ha 수준(아세톤 및 Tween-20의 최종농도가 각각 50%, 0.1% 함유)으로 경엽처리 한 후 동일한 조건에 두고 시기별로 제 2엽을 0.3g씩 취해 분석시료로 이용하였다. 엽맥과 엽맥 이외의 엽신부위로 나누어 조사하였는데 엽맥의 경우는 중륵만을 취하여 사용하였다.

Metsulfuron-methyl 처리에 의한 당 함량 변화를 조사하기 위해서는 약제처리된 옥수수를 생육실(낮-25℃/밤-15℃, 14시간 광주기, 180μmol/m²/sec)에 두면서 위에서와 같이 시기별로 시료를 취해 당함량을 조사하였다.

여러 화합물과 metsulfuron-methyl과의 혼합처리 실험은 온실 조건에서 수행하였고 이 때 isoleucine 및 valine은 각 1mM을, DCMU는 12.5, 25, 50g/ha 수준을 여러 농도의 metsulfuron-methyl과 혼합하여 경엽처리하였다. 처리 후 7일째의 시료를 가지고 anthocyanin을 분석하여 혼합처리효과를 조사하였으며 기타 실험 조건은 위와 동일하였다.

3. 당의 인위적인 공급이 옥수수 잎 절편의 anthocyanin 축적에 미치는 영향

실제 당이 anthocyanin 생합성에 영향을 미치는지 알아보기 위해서 다음과 같은 실험을 수행하였다. 백화 옥수수와 정상 옥수수 종자를 파종하여 제 3엽이 전개될 무렵 중륵이 제거된 제 2엽신을 3mm×3mm 크기로 절편화 하였다. 여러 농도의 sucrose가 들어있는 1mM MES buffer(pH 6.0) 7ml를 직경 5.5cm의 페트리디쉬에 분주한 후, 준비한 잎 절편을 0.15g

씩 펼쳐 놓고 25℃의 연속 명조건(77μmol/m²/sec)의 인큐베이터에 이틀동안 둔 다음, 형성된 anthocyanin을 분석하였다. Metsulfuron-methyl 자체가 anthocyanin생성에 직접적으로 영향을 미치는지를 알아보기 위한 실험에서는 백화조식만을 사용하였으며, sucrose를 1%로 고정시키고 metsulfuron-methyl의 농도를 1, 10, 100μM로 처리한 후 위와 동일한 조건에 두어 anthocyanin 형성정도를 조사하였다.

4. Metsulfuron-methyl이 광합성작용에 미치는 영향

Metsulfuron-methyl이 광합성작용에 미치는 영향을 보기 위해서 *in vivo*, *in vitro* 실험을 수행하였다. *In vivo* 실험의 경우 온실조건에서 자란 옥수수에 metsulfuron-methyl 또는 DCMU를 단독처리하거나 이들을 혼합처리한 다음, 처리후 1일째에 제 2엽신 중앙의 엽록소형광발산 정도를 측정(PAM-2000, Walz사)함으로써 상대적인 광합성전자전달 저해여부를 조사하였다^{17,32}. *In vitro* 실험의 경우 옥수수로부터 추출한 엽록체를 가지고 DCPIP를 이용한 Hill 반응을 조사하였다^{2,11}.

5. Anthocyanin과 당분석

Anthocyanin의 분석은 시료를 소량의 바다모래와 함께 총 10ml의 메탄올(1% HCl 포함)로 마쇄한 다음 이를 원심분리(27,200g, 15분, 4℃)한 후 분광광도계(Shimadzu, UV-2401PC)를 이용하여 분석하였고 그 함량은 흡광도(A528-0.25×A657)로 표시하였다²³.

당분석은 60℃에서 이틀동안 건조시킨 시료 10mg를 90% 에탄올로 추출한 후 anthrone 방법으로 전체 당함량을 조사하였다⁴¹.

結果 및 考察

1. Metsulfuron-methyl 처리에 의한 anthocyanin 및 당의 축적

온실 조건하에서 옥수수에 metsulfuron-methyl을 처리하고 시기별로 anthocyanin의 생성 변화

를 제 2엽 엽육 부위와 엽맥 부위로 나누어 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 엽육 부위와 엽맥부위 모두에서 처리 약량이 높고 시간이 경과함에 따라 anthocyanin 축적이 증가되었고 이러한 경향은 엽육보다 엽맥에서 더 현저히 나타났다. ALS 저해제들을 처리했을 때 anthocyanin이 증가된다는 것은 몇몇 연구자들에 의해 제시되었는데 Suttle과 Schreiner(1981)³⁵⁾은 DPX-4189를 콩 유묘에 처리하였을 때 자색물질이 축적되었다고 하였으며, Alla와 Younis(1995)¹⁾도 rimsulfuron을 옥수수과 콩 유묘에 처리했을 때 anthocyanin이 증가됨을 보고하였다.

Metsulfuron-methyl이 처리되었을 때 식물체 내 당함량은 어떻게 변화되는지를 알아보기 위해 metsulfuron-methyl이 처리된 옥수수를 생육실에서 기르면서 시기별로 당을 분석하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 시간별·약량별로 당함량이 증가되는 결과를 나타내어 anthocyanin 축적과 일치되는 경향을 보였다. Bestman 등(1990)⁴⁾의 실험에서도 chlorsulfuron을 field pennycress(*Thlaspi arvense* L.) 식물에 경엽처리 했을 때, 처리 24시간 후에는 sucrose가 37%, 30시간 후에는 247%가 증가되었다. 이와 같이 약제 처리에 의해 sucrose가 증가되는 것은 당이 만들어지는 source로부터 sink 조직으로의 이행이 억제됨으로 인해 당이 세포 내에 축적되는 것이라고 설명하고 있다^{18,19)}. 이와 유사한 결과는 chlorsulfuron을 *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* 같은 식물에 처리되었을 때에도 관찰되었다^{16,18)}.

2. Anthocyanin 축적과 ALS저해 및 광합성 산물과의 관련성

Metsulfuron-methyl에 의한 anthocyanin의 축적이 궁극적으로 ALS가 저해되거나 당 축적에 기인된 것이라면 ALS 저해로 인해 감소된 분지아미노산이나 당 생성을 저해하는 광합성 저해제를 처리하면 anthocyanin의 축적이 감소될 것이다. 이를 확인하고자 우선 ALS 저해제들에 의해 감소된다고 알려진 ILE과 VAL을 metsulfuron-methyl과 혼합처리한 후 anthocyanin 축

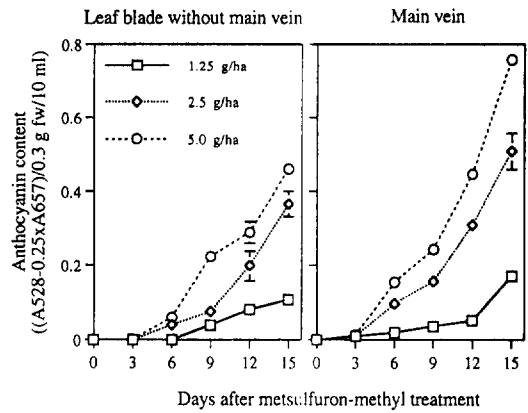


Fig. 1. Effect of metsulfuron-methyl on the anthocyanin formation in corn leaf. The herbicide was foliar-treated at early three leaf stage in greenhouse. Anthocyanin content was determined in the second leaf. Bars represent the standard deviation of three replicates.

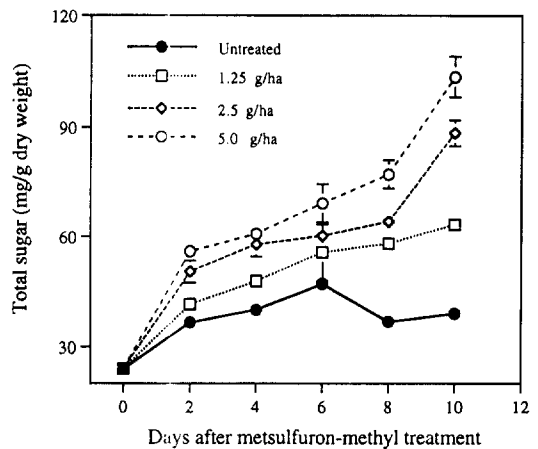


Fig. 2. The carbohydrate accumulation in corn leaf treated with metsulfuron-methyl. The herbicide was treated at early three leaf stage and grown in growth chamber (14hr photoperiod, 25°C day/15°C night, 180μmol/m²/sec). The second leaves were used for the carbohydrate analysis. Bars represent the standard deviation of three replicates.

적 변화를 살펴 보았다. 그 결과 metsulfuron-methyl 단독 처리구에 비해 분지 아미노산을 함께 처리했을 때 anthocyanin의 축적량이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이것은 ALS 저해제에 의해 생성되지 못했던 분지아미노산들이 외부에서 공급됨으로써 옥수수 내의 생리현

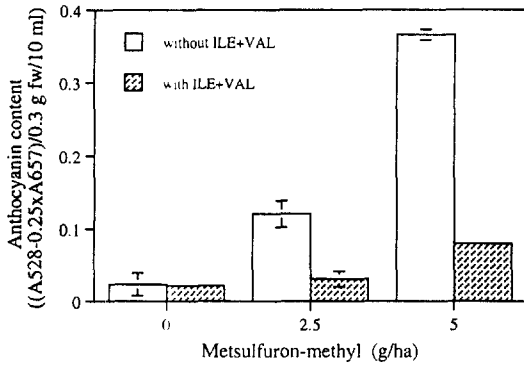


Fig. 3. Effect of exogenous isoleucine(ILE) and valine(VAL) on the anthocyanin formation in corn leaf treated with metsulfuron-methyl. Anthocyanin content was determined in the second leaf at 7 days after treatment. Bars represent the standard deviation of three replicates.

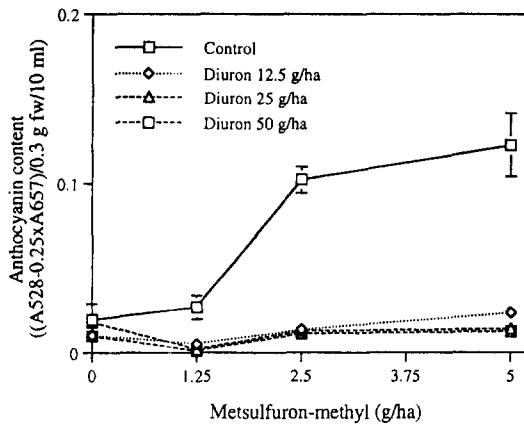


Fig. 4. Effect of diuron on the anthocyanin formation in corn leaf treated with metsulfuron-methyl. Anthocyanin content was determined in the second leaf at 7 days after treatment. Bars represent the standard deviation of three replicates.

상이 어느 정도 정상적으로 회복되기 때문으로 보인다. 이와 유사한 실험으로 Ray 등 (1984)²⁸⁾은 완두콩 뿌리에 chlorsulfuron을 처리한 다음, 외부에서 VAL과 ILE를 공급해 주면 뿌리의 성장 저해가 회복된다고 하였다.

당은 전분과 같은 저장양분이 분해되어 생기기도 하지만 녹색식물의 대부분은 광합성 작용으로부터 생성되어 사관을 통해 필요한 각 기

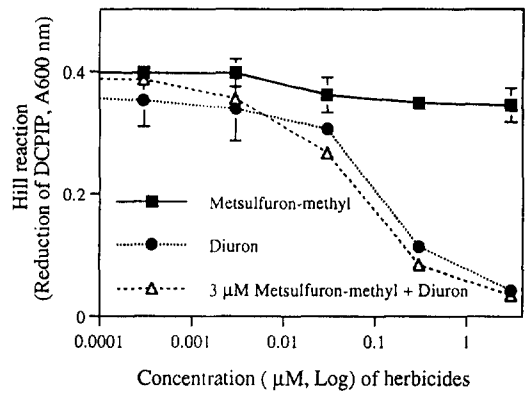


Fig. 5. Effect of metsulfuron-methyl and diuron on the Hill reaction in thylakoid membranes extracted from corn leaf. Assay medium contained 12.5µg/µl chlorophyll and 95µM DCPIP was illuminated for 2 min with a light intensity of 640µmol/m²/sec. Bars represent the standard deviation of three replicates.

관으로 이동된다. 이동된 당은 각종 대사 과정에 필요한 에너지로서 또는 세포의 구성 물질을 만드는데 사용된다. 따라서 잎 조직(Source)에 당이 비정상적으로 축적되었다는 것은 당의 이동이 저해를 받아 세포 또는 사관조직에 머물러 있거나, 광합성량이 소모량보다 극히 많아졌기 때문일 수 있다. 그러므로 광합성 저해제를 처리하면 궁극적으로 당 함량이 적어지게 될 것이며, 당과 anthocyanin이 직접적으로 관계가 있다면 이로 인해 anthocyanin 함량도 낮아지게 될 것이다. 이를 확인하기 위해 대표적인 광합성 저해제인 DCMU와 metsulfuron-methyl을 약량별로 혼합처리하여 비교해 보았다. Fig. 4에서와 같이 DCMU의 처리약량이 높을수록 anthocyanin의 생성이 거의 이루어지지 않았는데 이것은 초기의 가정대로 anthocyanin의 생성이 당과 관련이 있다는 것을 시사해 준다.

한편 metsulfuron-methyl 처리시 당이 축적된다면 광합성 작용에 영향이 없어야 될 것이다. 실제 그러한지를 *in vitro* 조건과 *in vivo* 조건 모두에서 검토해 보았다. 먼저 *in vitro* 실험의 경우 엽록체를 이용한 Hill 반응을 조사해 보았는데 Fig. 5에서와 같이 metsulfuron-methyl은

Hill 반응에 전혀 영향을 미치지 않았으며, DCMU와 혼합하였을 때에도 DCMU 단독처리의 효과만 나타났던 것으로 보아 metsulfuron-methyl은 전자전달계에 영향을 전혀 주지 않는 것으로 판단되었다. *in vivo* 조건에서도 metsulfuron-methyl 또는 DCMU를 단독으로 처리하거나 혼합처리하여 처리후 24시간째에 엽록소형광분석을 통한 전자전달 저해정도를 비교한 결과, DCMU는 현저히 억제시키는 경향이지만 metsulfuron-methyl은 PSII quantum yield에 전혀 영향을 미치지 못하였다(데이터 제시생략). 결국 metsulfuron-methyl은 광합성 작용에 영향을 미치지 않기 때문에 metsulfuron-methyl이 처리될지라도 당의 형성은 정상적으로 일어나는 것으로 간주된다. 그 후 계속적으로 형성된 당이 어떤 원인에 의해 타 기관으로 이동되지 못하거나 소모되지 못하고 생성조직 가까이에 어느 농도 이상으로 축적되는 것으로 보여진다. 본 실험의 이와 같은 결과는 chlorsulfuron 처리시 *Brassica napus*나 *Thlaspi arvense*의 순동화량이 무처리 식물과 비교하여 차이가 없었다는 보고와 같은 경향의 결과이다^{4,19}.

3. 당의 인위적 공급에 의한 anthocyanin 생성

Metsulfuron-methyl 저해제 처리시 anthocyanin 축적이 광합성 산물인 당과 관련이 있다면 실제 당을 공급했을 때도 anthocyanin이 축적되어야 할 것이다. 본 연구에서는 정상적인 녹색잎과 백화된 옥수수의 제 2엽 절편을 잘라 서로 다른 농도의 sucrose가 들어있는 MES buffer에 띄워 anthocyanin의 생성 정도를 비교하였다. 그 결과 외부로부터 공급된 sucrose의 농도가 높아질수록 두 조직 모두에서 anthocyanin의 생성이 증가되었으며 그 증가 정도는 녹화잎보다 백화잎에서 더 높았다. 이들 결과는 체내 당 함량이 높을 경우 농도에 비례하여 anthocyanin이 형성될 수 있음을 입증해 주며 anthocyanin 생합성이 유도되기 위해서는 최소한으로 요구되는 당함량이 존재함을 보여준다(Fig. 6). 이와 같이 외부에서 인위적으로 당을 공급

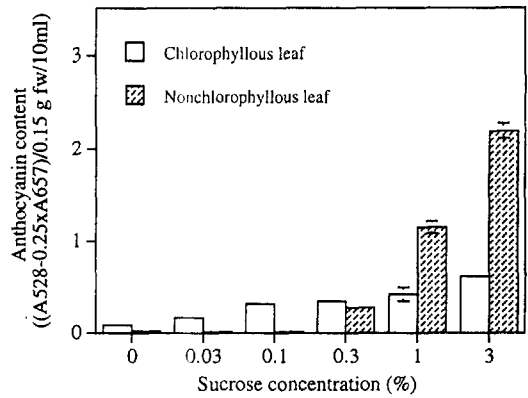


Fig. 6. Effect of exogenous sucrose on the anthocyanin formation in chlorophyllous or nonchlorophyllous corn leaf segments. The leaf segments were placed on sucrose solution in 1mM MES buffer and exposed to continuous light(77 μ mol/m²/sec) at 25 $^{\circ}$ C for 2 days. Bars represent the standard deviation of three replicates.

하였을 때, 당 농도에 따라 anthocyanin의 생성이 많아지는 것은 Mori 등(1994)²⁰의 실험에서도 보고된 바가 있는데, 딸기 잎 조직 배양시 배지의 sucrose농도에 따라서 anthocyanin 함량이 변하며 보통 sucrose 5% 정도일 때 최대가 되고 그 이상의 농도에서는 오히려 감소된다고 하였다. 또한, 포도 캘러스 배양시에도 sucrose가 anthocyanin의 증가를 유도시켰다^{3,13,40}. 이들 제반 결과는 당이 anthocyanin의 생성과 직접적인 관련이 있음을 증명해 준다.

4. 백화조직에서의 metsulfuron-methyl에 의한 anthocyanin 생성반응

지금까지 실험결과에 의하면 metsulfuron-methyl에 의한 anthocyanin의 축적이 식물체내 당축적과 관련이 있음을 시사해 주고 있으나 그와는 달리 metsulfuron-methyl이 anthocyanin 생합성과정 자체에 보다 직접적으로 영향을 미칠 가능성이 있다. 온실조건의 정상식물체를 이용해서는 이를 알아보기가 어렵기 때문에 본 연구에서는 백화조직을 이용하여 그 가능성을 검토하였다. 왜냐하면 엽록소가 없기 때문에 체내의 당형성 요인을 배제시킬 수 있고, 액포

에서 일어나는 anthocyanin의 생합성은 정상적으로 작동할 것이기 때문이다. 만일 metsulfuron-methyl이 체내의 anthocyanin 생성과정에 관련된 효소 등에 직접적으로 영향을 미쳐 자색을 유도하였다면 anthocyanin 생성과정이 정상적으로 작동되는 백화조직에서도 metsulfuron-methyl 처리에 의해 anthocyanin이 축적되어야 할 것이다. 그러나 본 실험의 결과는 그렇

지 못하였다(Fig. 7). 이는 metsulfuron-methyl이 anthocyanin 생합성과정 자체를 직접적으로 촉진하는 것은 아니라 당의 축적을 유도시킴으로서 간접적으로 작용을 하는 것임을 더욱 시사해 준다.

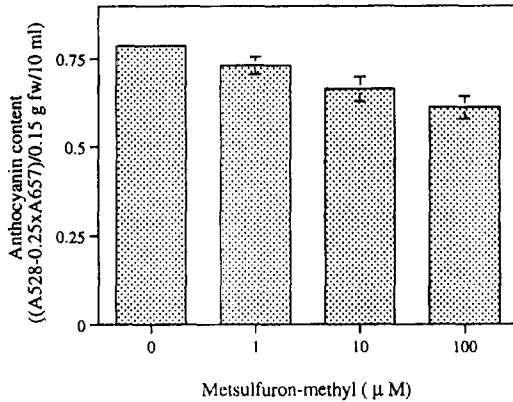


Fig. 7. Effect of metsulfuron-methyl on the anthocyanin formation in nonchorophyllous corn leaf segments. The leaf segments were placed on 1% sucrose solution in 1mM MES buffer and exposed to continuous light(77μmol/m²/sec) at 25°C for 2 days. Bars represent the standard deviation of three replicates.

5. 옥수수 변이주에서의 anthocyanin 축적

이상의 가정을 더욱 입증하기 위해서 anthocyanin 생합성에 관련된 구조·조절 유전자에 변이가 있는 옥수수에 약제를 처리한 후 그 반응성을 조사해 보았다.

옥수수에서 anthocyanin 축적이 이루어지기 위해서는 구조 유전자인 A1, A2, C2, Bz1, Bz2가 존재해야 한다. 이들의 공간 분포와 색소 분포 조절은 C1과 R에 의해 조절된다. 이 유전형질들의 열성인자들은 각각 anthocyanin 생합성 과정에 관여하는 효소가 결핍되어 있는 것으로서, 예를 들어, a1은 dihydroflavonol reductase, bz1은 UDPG-flavonol 3-o-glucosyl transferase, c2는 chalcone synthase가 결핍되어 있다^{9,10,14,36}). 따라서 metsulfuron-methyl에 의한 anthocyanin의 생성이 일부의 구조 유전자와 관련이 있다면 시험한 여러 변이 옥수수들 중 어느 한 개라도 anthocyanin이 형성되어야 한다. 그러나 Table 1에서 보는 바와 같이 구조 유전

Table 1. Effect of metsulfuron-methyl on the anthocyanin formation in mutant corn leaf¹⁾

Corn species	Genotypes	Increased anthocyanin content ((A528-0.25 × A657)/0.3g fw/10ml)
YP445	(R-r)RC1C2A1A2Bzbz2Pr	nd ²⁾
YP449	(R-r)RC1C2a1A2BzBz2Pr	nd
YP454	(R-r)RC1c2A1A2BzBz2Pr	nd
YP458	(R-r)RC1C2A1a2BzBz2Pr	nd
YP461	(R-r)RC1C2A1A2bzBz2Pr	nd
YP474	(R-r)Rc1C2A1A2BzBz2Pr	nd
YP810	(R-g)RC1C2A1A2BzBz2Pr	0.003 ± 0.001
YP813	(r-g)RC1C2A1A2BzBz2Pr	0.020 ± 0.010
YP814	(r-r)RC1C2A1A2BzBz2Pr	0.458 ± 0.023
YP809	(R-r)RC1C2A1A2BzBz2Pr	0.171 ± 0.009
Suweon 19		1.562 ± 0.053

¹⁾ The herbicide-treated corn was incubated in growth chamber(14hr photoperiod, 25°C day/15°C night, 180μmol/m²/sec) for 7 days. Anthocyanin content was determined in the second leaf. Data represent the mean ± standard error of three replicates.

²⁾ nd : not detected.

자에 변이가 있는 모든 옥수수에서는 *metsulfuron-methyl*에 의해 *anthocyanin*이 축적되지 않았다. 이는 *metsulfuron-methyl*이 구조 유전자 발현 이전 단계에 영향을 미침을 의미한다, 한편 조절 유전자에 이상이 있는 개체들을 살펴보면 R-g는 호분에만 *anthocyanin*이 형성되는 변이주이고 r-g는 옥수수 어느 부위에서도 색이 발현되지 않는 변이주이다. R-r은 정상 식물체이며 r-r은 호분 이외의 조직에서 *anthocyanin*이 형성되는 변이주이다⁹⁾. 이들 옥수수에 *metsulfuron-methyl*을 처리해 본 결과 R-g와 r-g에서는 *anthocyanin* 형성이 이루어지지 않았지만, R-r과 r-r에서는 *anthocyanin*이 축적되는 경향이있으며 R-r보다 r-r에서 약간 높았다(Table 1). 이는 *metsulfuron-methyl* 처리에 의한 *anthocyanin*의 생성이 보다 up-stream 쪽에, 즉 조절 유전자의 작동과 관련이 있음을 의미한다.

이미 알려진 바와 같이 *anthocyanin*의 생성에는 외부환경에 영향을 받으며 특히 저온, 강광, 광질, 수분스트레스, 화학물질 등에 의해 *anthocyanin* 형성이 유도되거나 촉진된다^{8,20,23,26)}. 최근의 연구들에 의하면 당이 보다 직접적으로 *anthocyanin*형성의 자극제로서 역할을 한다는 증거들이 제시되고 있다^{33,37)}. 한편 Suttle (1981)³⁵⁾은 콩 유묘에 DPX-4189를 처리하였을 때 ethylene과 *anthocyanin*이 증가되는데 이 때 생성되는 ethylene이 *anthocyanin*의 생합성에 직접적인 관련이 없었다고 하였다. 이들의 결과와 본 연구결과들을 종합해 볼 때, *metsulfuron-methyl*처리시 광합성에 의해 생성된 당들은 다른 기관으로 이행되지 못해 잎에 축적되고 이것이 일정 수준 이상으로 높아지면 sugar-responsive domain이 활성화되고 이로 인해 *anthocyanin*생성에 관여하는 gene이 활성화되어 색소가 축적되는 것으로 생각되어진다. 그리고 이는 식물체 자체가 가지고 있는 *anthocyanin*형성과 관련한 유전형질과 주변 환경조건에 상대적으로 영향을 받을 것으로 보인다. 따라서 *metsulfuron-methyl*을 처리했을 때 기본적으로 *anthocyanin* 형성이 잘되는 식물(옥수수, 콩, 바랭이, 수수 등)이 있는 반면에 *anthocyanin* 축

적이 잘 일어나지 않는 식물(벼, 까마중 등)이 있고, 동일약제를 처리하였을 때 봄, 가을에는 자색이 잘 발현되지만 여름에는 잘 나타나지 않는 것도 이에 기인하는 것으로 해석된다. 이에 관련하여 보다 직접적인 증거를 얻기 위해서는 향후 분자생물학적 연구가 필요하다 하겠다.

한편 이들의 제반현상과 살초기작과의 관계를 보면, 일반적으로 ALS 저해제를 처리하였을 때 죽음에 이르기까지의 속도가 다른 제초제를 처리했을 때보다 느다. 이처럼 살초과정이 서서히 일어나는 원인으로서, ALS 저해로 인해 분지 아미노산이 생성되지 않으면 체내의 가용성 단백질이 아미노산으로 분해되면서 이들이 모두 소모될 때까지 살초 작용이 발현되지 않기 때문이거나¹⁵⁾, ALS저해제가 작용점과 느린 결합(slow binding)을 하기 때문이라고^{12,30)} 추측할 수 있으나, 본 연구결과로 볼 때는 생리적인 차원에서 다른 해석도 가능할 것으로 보여진다. 즉 당은 지나치게 축적되지 않는 이상 노화를 지연시키는 역할을 하기 때문에 ALS 저해 제초제가 처리된 식물체의 기존 잎은 축적된 당으로 인해^{18,19)} 노화가 지연될 수 있다. 또한 당에 의해 축적되는 *anthocyanin*이 항산화 기능을 가지는 것으로 보고되고 있는데^{6,38)} 여러 종류의 *anthocyanin* 중에서도 cyanidin 항산화 기능이 크게 나타났고 cyanidin에 glucose가 결합된 cyanidin-3-glucoside의 경우는 보다 높은 항산화 기능을 가지는 것으로 보고되고 있다³⁹⁾. 이런 점을 감안해 보면 ALS저해 제초제 처리시 축적된 당과 *anthocyanin*이 노화 지연과 항산화 작용을 유도함으로써 살초기작이 서서히 진행될 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 이와 관련된 실험은 더욱 진행되어야 할 것이다.

摘 要

Metsulfuron-methyl 처리시 옥수수에 발현되는 자색화의 원인을 알아보기 위하여 제반실험을 수행하였다.

Metsulfuron-methyl 처리시 농도와 시간에 의존하여 당과 anthocyanin의 함량이 증가되었고, 증가된 anthocyanin은 ILE + VAL이나 DCMU 처리에 의해서 경감되었다. 당을 외부로부터 공급하였을 때 당 농도에 의존하여 anthocyanin 함량이 증가되었고, 당형성이 제한되어 있는 백화조직에서는 metsulfuron-methyl 처리로 anthocyanin 생성이 증가되지 않았다. 그리고 metsulfuron-methyl은 광합성 자체를 억제하지 않았다. Metsulfuron-methyl에 의한 anthocyanin 축적을 구조 유전자 변이주 모두에서는 관찰할 수 없었고, 조절유전자 변이주 중에서는 R-r, r-r에서만 anthocyanin 축적을 관찰할 수 있었다. 이들의 제반 결과는 metsulfuron-methyl이 처리되면 광합성 산물인 당이 축적되고, 이는 anthocyanin 생합성 과정에 관련된 유전자를 자극함으로써 anthocyanin 생합성과정을 활성화시키며 이로 인해 옥수수가 자색화됨을 시사해 준다.

감사의 글

본 실험에 사용된 변이옥수수를 분양해 주신 충남대학교 임용표 교수님께 감사드립니다.

引用文獻

- Alla, M.M. and M.E. Younis. 1995. Herbicide effects on phenolic metabolism in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) seedling. *J. Exp. Bot.* 46(292) : 1731 -1736
- Anderson, M.P., C.N. Bensch and J.F. Stritzke. 1994. A rapid microtitre plate assay for determining sensitivity to photosystem II herbicides. *Weed Sci.* 42 : 517-522.
- Andrew, P. and G.M. Michael. 1976. Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate and abscisic acid. *Plant Physiol.* 58 : 468-472
- Bestman, H.D., M.D. Devine and W.H. Vandenberg. 1990. Herbicide chlorsulfuron reduces assimilate transport out of treated leaves of field pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 93 : 1441-1448
- Blair, A.M. and T.D. Martin. 1988. A review of the activity, fate and mode of action of sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.* 22 : 195-219
- Cao, G., E. Sofic and R.L. Prior. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids : Structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.* 22 (5) : 749-760
- Caroline, S. 1991. Sulfonylurea herbicides. p. 51. PJB publication, Ltd.
- Chrisrie, P.J., M.R. Alfenito and V. Walbot. 1994. Impact of low-temperature stress on the accumulation of anthocyanin in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Can. J. Bot.* 68 (8) : 1822-1825.
- Coe, E.H. and M.G. Neuffer. 1976. The genetics of corn. pp.111-223. In G.F. Sprague (ed.) Corn and corn improvement. The American Society of Agronomy, Inc., Publisher Madison, Wisconsin, USA.
- Coe, E., G.N.D. Hoisington and S. Chao. 1991. Gene list and working maps. In Maize genetics cooperation newsletter. Department of Agronomy and U.S. Department of Agriculture University of Missouri Columbia, Missouri.
- Darr, S., V.S. Machado and C.J. Arntzen. 1981. Uniparental inheritance of a chloroplast photosystem II polypeptide controlling herbicide binding. *Biochem. Biophys. Acta.* 634 : 219-218
- Dumas, R.D., F. Vives, D. Job and R. Douce. 1995. Inhibition of acetohydroxy acid isomeroreductase by reaction intermediate analogues : herbicidal effect, kinetic analysis and 3-D structural studies. Brighton Crop Protection Conference -Weeds 3 : 833-850.
- Francois, C., H.A. Crevier and C.B. Do-

1990. Effect of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanin in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Can. J. Bot.* 68 : 1822-1825
14. Galbiati, M., A. Chiusi and P. Peterlongo. 1994. Photoinduction of anthocyanin in maize ; A genetic approach. *Maydica.* 39 : 89-95.
 15. Goldberg, A.L. and A.C. John. 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. part 2. *Annu. Rev. Biochem.* 45 : 747-755.
 16. Hall, L.M., and M.D. Devine. 1993. Chlorsulfuron inhibition of phloem translocation in chlorsulfuron-resistant and -susceptible *Arabidopsis thaliana*. *Pestic. Biochem. and Physiol.* 45 : 81-90
 17. Joshi, M.K. and P. Mohanty. 1995. Probing photosynthetic performance by chlorophyll a fluorescence : Analysis and interpretation of fluorescence parameters. *J. Sci. Ind. Res.* 54 : 155-174.
 18. Kim, S.M. and W.H. Vanden Born. 1996. Chlorsulfuron decreases both assimilate export by source leaves and import by sink leaves in Canola (*Brassica napus* L.) seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.* 56 : 141-148
 19. Kim, S.M. and W.H. Vanden Born. 1997. Carbon allocation and translocation in chlorsulfuron-treated Canola (*Brassica napus* L.). *Weed Sci.* 45 : 466-469.
 20. Knobloch, K.H., G. Bast and J. Berlin. 1981. Medium- and light- induced formation of serpentine and anthocyanin in cell suspension cultures of *Catharanthus Roseus*. *Phytochemistry* 21 (3) : 591-594.
 21. LaRossa, R.A. and J.V. Schloss. 1984. The sulfonyleurea herbicide sulfometuron-methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 259 : 8753-8757.
 22. LaRossa, R.A., T.K. VanDyk and D.R. Smulski. 1987. Toxic accumulation of α -ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriology* 169 : 1372-1378.
 23. Mancinelli, A.L. 1990. Interaction between light quantity in the photo-regulation of anthocyanin production. *Plant Physiol.* 92 : 1191-1195.
 24. Mazur, B.J. and S.C. Falco. 1989. The development of herbicide resistant crops. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 40 : 441-470.
 25. Moberg, W.K. 1990. Herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis. *Pestic. Sci.* 92 : 241-246
 26. Mori, T. and M. Sakurai. 1994. Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures ; Effects of sugar and nitrogen. *J. Food Sci.* 59 (3) : 588-593.
 27. Ray, T.B. 1980. Studies on the mode of action of DPX-4189. Brighton Crop Protection Conference-Woods 1 : 7-14.
 28. Ray, T.B. 1984. Site of action of chlorsulfuron. Inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plant. *Plant Physiol.* 75 : 827-831.
 29. Rost, T. 1984. The comparative cell cycle and metabolic effects of chemical treatments on root tip meristems. III. chlorsulfuron. *J. Plant Growth Regul.* 3 : 51-63.
 30. Schloss, J.V. 1984. Interaction of the herbicide sulfometuron methyl with acetolactate synthase : a slow binding inhibitor. pp.737-740 In R.C. Bray, P.C. Engel, and S.G. Mayhew(eds.) *Flavins and Flavoproteins*.
 31. Schloss, J.V., L.M. Ciskanik and D.E. Van Dyk. 1988. Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. *Nature* 331 : 360-362.
 32. Schreiber, U., M. Kuhl, I. Klimanant and H.

- Reising. 1996. Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynth. Res.* 47 : 103-109.
33. Smeekens, S. and F. Rook. 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plant. *Plant Physiol.* 115 : 7-13
34. Stidham, M.A. 1991. Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. *Weed Sci.* 39 : 428-434
35. Suttle, C. and Schreiner, R. 1981. Effects of DPX-4189 (2-chloro-N((4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)amino-carbonyl)benzenesulfonamide) on anthocyanin synthesis, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene production in soybean hypocotyls. *Can. J. Bot.* 60 : 741-745.
36. Taylor, L.P. and W.R. Briggs. 1990. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. *Plant Cell* 2 : 115-127
37. Tsukaya, H., T. Ohshima, S. Naito, M. Chino and Y. Komeda. 1991. Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 97 : 1414-1421
38. Wang, H., G. Cao and R.L. Prior. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food. Chem.* 45 : 304-390.
39. Wood Mackenzie. 1998. Agrochemical service. Update of the products section. Edinburgh, London.
40. Yamakawa, T., S. Kato, K. Ishi, T. Kodama and Y. Minoda. 1983. Production of anthocyanin by *Vitis* cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.*, 47 (10) : 2185-2191.
41. Yoshida, S. and D. Forno. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. pp. 46-49. The International Rice Research Institute, Los Banos, Laguna, Philippines.