

Superoxide Dismutase와 Ascorbate Peroxidase가 엽록체내로 동시에 과대발현된 형질전환 담배의 제초제들에 대한 항산화 반응

김진석^{*1}, 이병희¹, 권석윤², 김윤희², 김소희¹, 조광연¹

¹한국화학연구원 생물기능연구팀, ²한국생명공학연구원 환경생명공학연구소

Antioxidative Responses of Transgenic Tobacco Plants Expressing both Superoxide Dismutase and Ascorbate Peroxidase in Chloroplasts to Several Herbicides

Jin-Seog Kim^{1*}, Byung-Hoi Lee¹, Suk-Yoon Kwon², Yun Hee Kim², So-Hee Kim¹, Kwang Yun Cho¹

¹Biological Function Research Team, Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT), Daejeon 305-600, Korea,

²Laboratory of Environmental Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),

Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT Antioxidative responses of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in chloroplasts was investigated with several herbicides. In greenhouse test, tolerance of SOD/APX-overexpressed tobacco (CA) to photosystem (PS) I inhibitor paraquat was increased by about 40%. However, any response differences between CA and wild type (WT) tobacco was not observed in a treatment with PS II inhibitors (bromoxynil, diuron and bromacil), chlorophyll biosynthesis inhibitor (oxyfluorfen), carotenoid biosynthesis inhibitor (fluridone) and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase inhibitor (glyphosate). This tendency was also similar in the growth chamber test of low light intensity, using paraquat and diuron. That is, increased antioxidant activity of CA was shown only in paraquat treatment. When paraquat was foliar-treated to 6 to 9-leaf stage plant, the third to fourth placed leaf from shoot tip showed relatively higher antioxidant activity. Ascorbate supplemented to paraquat solution alleviated the phytotoxicity with a similar range in both CA and WT. In conclusion, CA specifically responded to oxidative stress induced by paraquat among tested herbicides in a whole plant assay.

Key words: Antioxidative response, herbicides, oxidative stress, paraquat, SOD/APX-overexpressed tobacco

서 론

산소는 호기성 생물의 생존에 필수적인 분자이지만 반응에 따라서는 치명적인 유해분자로 변할 수 있다. 산소의 여기된 상태나 전자가 추가되어 화학반응 속도가 빠르게 된 분자종을 활성산소라 일컬으며 이에는 singlet oxygen,

superoxide, hydrogen peroxide, hydroxy radicals 등이 있다 (Bartosz 1997). 이들은 세포 주변의 물질들과 빠르게 반응하여 각종 장애를 일으킬 확률이 높기 때문에 생물은 이를 소거할 수 있는 항산화체계를 잘 발달시켜 운영하고 있다. 매우 다양한 기작으로 활성산소가 소거되며 이에 관여하는 항산화물질로서는 tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, 기타 페놀류 등이 있으며 항산화 효소로서는 superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase, 기타 여러 reductase 들이 있다 (Foyer 1994; Bartosz 1997).

*Corresponding author Tel 042-860-7026 Fax 042-861-4913

E-mail: jskim@kriict.re.kr

식물의 엽록체는 산소조건에서 빛에너지를 화학에너지로 변환시키는 체계를 갖고 있으므로 자연조건에서 활성산소 발생가능성이 매우 높음과 동시에 이에 대비한 항산화 체계가 가장 잘 발달되어 있는 대표적인 세포소기관이다. 정상조건에서는 photosystem (PS) I에서 활성산소 (superoxide)가 많이 발생하는데 이는 Cu/ZnSOD에 의해 과산화수소로 전환되며 과산화수소는 ascorbate peroxidase에 의해 물로 소거된다. 이 반응에는 환원제로서 ascorbate가 관여하며 산화된 ascorbate 즉 dehydroascorbate 또는 monodehydroascorbate는 각각 dehydroascorbate reductase (DHAR) 또는 monodehydroascorbate reductase (MDAR)에 의해 ascorbate로 전환된다. 한편 DHAR 반응에는 glutathione의 산화환원이 요구되며 이에 glutathione reductase의 활성화가 동반되어야 한다고 한다 (Alscher 1997; Asada 1999).

현재 연구자들은 환경복합내성식물을 제작하려고 노력하는 바, 이를 달성하기 위한 전략의 하나로서 항산화시스템 관련 효소의 유전자를 도입하여 과대발현 시키고 있다 (Kwon et al. 2002). 항산화시스템 형질전환 식물은 제초제의 살초기작을 이해하는 데에도 유용하게 활용될 수 있다. 왜냐하면 제초제 중에는 엽록체를 공격하여 작용하는 화합물이 약 40-50% 존재하며, 이들은 초기 작용점이 서로 다를지라도 궁극적으로 식물체를 죽게 하는 데에는 활성산소가 크게 기여하는 것으로 이해되고 있기 때문이다 (Hess 2000; Rutherford and Krieger-Liszkay 2001; Kim et al. 2002). 엽록체에 작용점을 가지며 살초기작에 활성산소가 보다 크게 관련되어 있다고 여겨지는 대표적인 제초제들과 이의 주요 기작으로서는 (Hess 2000; Kim et al. 2002), 1) PS I으로부터 전자를 탈취하여 작용성을 나타내는 paraquat (PQ), 2) PS II의 D1 protein에 결합하여 전자전달을 차단하는 bromoxynil, bromacil, diuron 등, 3) PS II의 활성산소 소거 기능을 가진 카로티노이드의 생합성을 phytoene desaturase 단계에서 저해하는 fluridone, 4) 엽록소 생합성 과정의 protoporphyrinogen IX oxidase (PPO)를 저해하고, 이로 인해 축적된 protoporphyrin IX (PPIX)로 하여금 대량의 활성산소를 발생케 하는 oxyfluorfen, 5) 광합성전자전달자 역할을 하는 plastoquinone 분자의 생합성을 hydroxyphenylpyruvate dehydrogenase 단계에서 저해하는 sulcotrione 등이 있다 (Lee et al. 1997). 그러나 이들의 살초기작에 항산화체계가 구체적으로 어느 정도 관여되어 있으며 그 특이성은 어떠한지에 대한 연구는 거의 이루어지지 못하고 있다. 이의 연구를 위해서는 항산화시스템 형질전환 식물이 유용하게 활용될 수 있다. 한편, 현재 제초제 분해 유전자를 도입하거나 작용점 효소를 변형시켜 제초제 저항성 작물이 만들어져 상용화 되고 있지만 금후는 다양한 형질이 추가적으로 도입되어 복합 기능의 형질전환작물이 개발될 것으로 여겨진다. 예를 들면, 항산화 체계가 활성화 되

어 불량환경 적응력이 뛰어나면서도 제초제 저항성을 가지는 작물의 창출은 작물재배의 생력화 및 생산성 향상에 크게 기여할 것이다.

따라서 본 연구에서는 superoxide dismutase (CuZnSOD)와 ascorbate peroxidase (APX)가 동시에 과대 발현되도록 형질전환된 담배를 대상으로 작용 기작이 서로 다른 여러 제초 화합물들에 대한 반응 특성을 검토함으로써 살초기작과 항산화체계간의 특이성과 chemical stress 내성작물 제작 전략의 기초 자료로 얻고자 실험하였다.

재료 및 방법

식물재료와 시험 화합물

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)를 식물재료로 사용하였다. 형질전환체는 Kwon 등 (2002)에 의해 제작된 것을 사용하였으며 이는 CaMV 35S promoter를 이용하여 완두의 CuZnSOD 유전자와 APX 유전자가 동시에 과대 발현되도록 하였으며, 생성된 단백질은 엽록체에 유입되도록 제작되었다 (이하 CA 담배라고 함). 처리 화합물은 원제형태의 paraquat (순도 97% 이상), bromoxynil (순도 97% 이상), diuron (순도 80%), bromacil (순도 97% 이상), oxyfluorfen (순도 97% 이상), fluridone (순도 95% 이상), glyphosate (순도 64.5%)를 사용하였다.

CA 담배의 여러 가지 제초제들에 대한 반응

시험 종자를 육묘상자에 파종하고 2엽 정도 생육시켰다. 이를 부농 원예용 상토 5호가 담긴 직경 9 cm, 높이 8.5 cm 화분에 이식한 후 온실조건에서 키워 본엽이 5~6매 이상 전개되었을 때 hand sprayer (Wider-61, Anest-Iwata, Yokohama, Japan)로 약제를 경엽 처리하였다. 약제를 용매에 녹인 다음 계면활성제 Tween 20이 포함된 용액으로 희석하여 잎 전면에 충분히 묻도록 처리하였다. 처리 당시 사용했던 용매의 최종농도는 glyphosate와 PQ의 경우 아세톤 20%, 기타 약제는 아세톤 50%이었고, Tween 20의 최종농도는 모두 0.1%로서 상기 농도에서는 약해를 유발시키지 않았다. 약제처리 후 제초활성 발현은 온실조건 (14시간 광주기, 주간 평균온도 30°C/야간 평균온도 20°C)에서 실시하였으며, 약제처리 후 5일과 10일째에 0~100% 등급표 (0: 효과 없음, 100: 완전고사)에 준하여 육안으로 조사하였다 (Frans et al. 1986).

담배의 엽위별 paraquat 처리에 대한 반응

자엽출현 이후 본엽이 6~7매 채 또는 9매 채 전개되고 있는 식물체 중에서 크기가 일정한 것을 골라 약제처리 하

었다. PQ 약제를 물에 녹인 다음, 계면활성제 Tween 20이 포함된 용액으로 희석하여 30 μM 수준으로 경엽처리 하였다. 기타 방법은 전술한 바와 같다.

약광에서의 paraquat와 diuron에 대한 반응

본엽이 5-6매 켜 전개되고 있는 담배 식물체 중에서 크기가 일정한 것을 골라 약제처리 하였다. PQ와 diuron을 물에 녹인 다음 계면활성제 Tween 20이 포함된 용액으로 희석하여 잎 전면에 충분히 묻도록 처리하였다. 그 후 이들을 생육실 (14시간 광주기, 70 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 28°C 항온)에 두어 제초효과를 발현시켰다. 기타 방법은 전술한 바와 같다.

Paraquat와 ascorbic acid 혼합처리간의 반응

본엽이 6매 켜 전개되고 있는 담배 식물체 중에서 크기가 일정한 것을 골라 약제처리 하였다. 아세톤과 Tween 20의 최종농도는 각각 20%, 0.1%인 용액에 PQ를 30 μM 과 60 μM 되도록 가한 다음, 각각의 용액에 ascorbic acid를 첨가하여 최종 농도가 0.5, 5, 50 mM 되도록 혼합용액을 조제 하였다. 이를 hand sprayer로 잎 전면에 충분히 묻도록 처리하였다. 약제처리 후 제초활성 발현은 온실조건 (14시간 광주기, 주간 평균온도 30°C / 야간 평균온도 20°C)에서 실시하였으며 기타 방법은 전술한 바와 같다.

결과 및 고찰

CA 담배의 여러 가지 제초제들에 대한 반응

제초제들 중 살초기작에 활성산소 발생 (oxidative stress) 과 어느 정도 관련이 있는 화합물이 항산화체계가 증진된 식물체에 처리되면 보통의 식물체보다 내성을 나타낼 가능성이 있다. 그러나 내성발현 여부 또는 그 정도는 처리된 화합물의 작용기작과 식물체의 항산화 증진 기구에 따라 다를 것이다. 왜냐하면 식물체의 항산화 발현 기작은 여러 종류가 있을 뿐만 아니라 세포내 발현 부위도 세포질, 세포막, 엽록체, 퍼옥시좀 등 다양하기 때문이다. 본 연구에서는 엽록체 내에 Cu/ZnSOD와 APX가 동시에 과대 발현되는 담배를 가지고 실험하였다. 그렇기 때문에 공시된 제초제의 살초기작에 이들이 관련되어 있다면 대조 식물체 (WT)보다 CA 식물체가 내성을 나타낼 것이다.

PQ는 PS I으로부터 전자를 탈취하여 스스로 라디칼 화되고 주변의 산소와 반응함으로써 활성산소를 대량으로 발생시키는 화합물이다 (Babbs et al. 1989; Hess 2000). 120 μM 농도로 처리될 경우 WT와 CA간에 처리 후 5일째의 조직 고사정도는 비슷하였지만 30 μM 과 60 μM 처리 농도

에서는 CA에서 각각 16%, 35%의 제초활성 경감이 관찰되었다 (Table 1, Figure 1). Bromoxynil, bromacil, diuron은 PS II의 D1 protein에 결합하여 전자전달을 차단한다고 알려진 제초제이다 (Kim et al 2002). 이들이 처리되면 PS II 반응 중심에서 발생된 전자의 흐름이 차단되어 전하분리가 일어나고 이어 엽록소 소실은 물론 이들이 주변의 산소와 반응하여 singlet oxygen이 발생하며 (Rutherford and Krieger-lizskay 2001) 그 다음의 연속적인 반응으로 superoxide, hydroxyl radical 등을 발생시키고 심하면 틸라코이드 막이 파괴된다고 한다 (Fuerst and Norman 1991; Hess 2000). 이들은 상대적으로 paraquat보다 제초활성 발현 속도가 느렸지만 전형적으로 잎의 황화 (chlorosis) 및 조직 고사가 일어났다. 그러나 WT와 CA간의 증상발현 속도 또는 제초활성 정도의 차이는 전혀 관찰되지 않았다 (Table 1, Figure 1). 이는 Cu/ZnSOD와 APX가 PS II에서 일어나는 산화 스트레스를 경감시키지 못함을 보여준다. Fluridone은 phytoene desaturase 활성을 저해하여 카로티노이드의 생합성을 억제한다 (Böger 1996). 카로티노이드 (carotenes, xanthophylls)는 특히 PS II에서의 활성산소 소거 기능을 가지기 때문에 (Koyama 1991), 카로티노이드 저해제가 처리되면 식물체에서 엽록소 소실로 인한 신엽의 백화와 이미 발달된 조직에서는 세포파괴로 인한 위조 고사가 일어난다 (Kim et al. 2004). 본 실험의 fluridone 처리의 경우에서도 WT와 CA간에 증상발현 속도 또는 제초활성 정도의 차이는 전혀 관찰되지 않았다 (Table 1, Figure 1). Oxyfluorfen은 엽록소 생합성 과정의 PPO를 저해하여 세포내에 PPIX을 과량으로 축적시킨다. PPIX은 photosensitizer이기 때

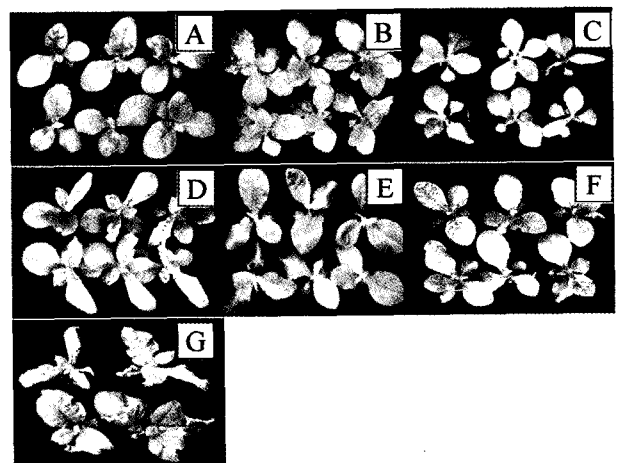


Figure 1. Herbicidal responses and symptoms of SOD/APX-overexpressed (CA) and wild type (WT) tobacco to several compounds in greenhouse. A, 5 d after 11.9 μM bromacil treatment; B, 5 d after 11.2 μM bromoxynil treatment; C, 5 d after 35 μM diuron treatment; D, 5 d after 3.8 μM fluridone treatment; E, 5 d after 1,480 μM glyphosate treatment; F, 5 d after 3.8 μM oxyfluorfen treatment; G, 3 d after 61 μM paraquat treatment.

Table 1. Herbicidal responses of SOD/APX-overexpressed (CA) and wild type (WT) tobacco to several compounds in greenhouse

Herbicides	Rate (μ M)	Injury % at 5 DAT		Injury % at 10 DAT	
		Wild type	CA	Wild type	CA
Bromacil	6.0	15.0 \pm 2.0	10.0 \pm 2.0	12.5 \pm 3.2	8.8 \pm 1.3
	11.9	62.5 \pm 4.8	57.5 \pm 7.2	62.5 \pm 7.7	60.0 \pm 3.8
	23.8	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
Bromoxynil	5.6	16.3 \pm 1.3	13.8 \pm 2.4	11.3 \pm 1.3	11.3 \pm 1.3
	11.2	27.5 \pm 4.8	33.8 \pm 2.4	27.5 \pm 2.5	31.3 \pm 1.3
	22.4	82.5 \pm 6.3	82.5 \pm 9.2	80.0 \pm 9.1	76.3 \pm 7.2
	44.8	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
Diuron	17	26.5 \pm 3.8	26.3 \pm 3.8	32.5 \pm 4.8	30.0 \pm 4.1
	35	52.5 \pm 2.5	57.5 \pm 4.8	82.5 \pm 6.0	90.0 \pm 4.1
	52	92.5 \pm 2.5	91.3 \pm 1.3	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
Fluridone	0.95	15.0 \pm 2.0	15.0 \pm 2.9	8.8 \pm 3.1	10.0 \pm 2.0
	1.9	23.8 \pm 3.1	20.0 \pm 3.5	21.3 \pm 1.3	21.3 \pm 2.5
	3.8	40.0 \pm 2.0	47.5 \pm 4.8	38.8 \pm 2.5	48.8 \pm 3.8
	7.6	61.3 \pm 5.5	66.3 \pm 2.4	65.0 \pm 2.9	65.0 \pm 2.0
	15.2	70.0 \pm 0.0	72.5 \pm 3.2	76.3 \pm 1.3	80.0 \pm 4.6
Glyphosate	185	22.0 \pm 1.2	23.0 \pm 1.2	50.0 \pm 3.2	54.0 \pm 2.4
	370	29.0 \pm 1.0	30.0 \pm 0.0	60.0 \pm 0.0	63.0 \pm 2.0
	740	35.0 \pm 3.9	32.0 \pm 1.2	67.0 \pm 1.2	72.0 \pm 2.0
	1,480	37.0 \pm 2.5	42.0 \pm 3.7	85.0 \pm 4.2	86.0 \pm 2.4
Oxyfluorfen	3.8	41.3 \pm 1.3	38.8 \pm 2.4	40.0 \pm 2.0	43.8 \pm 3.8
	7.7	75.0 \pm 3.5	70.0 \pm 2.0	57.5 \pm 3.2	55.0 \pm 2.0
	13.4	88.8 \pm 2.4	87.5 \pm 1.4	80.0 \pm 0.0	83.8 \pm 2.4
	26.8	88.8 \pm 3.1	86.3 \pm 3.8	90.0 \pm 0.0	90.0 \pm 0.0
Paraquat	31	25.0 \pm 3.2	9.0 \pm 4.2		
	61	64.0 \pm 2.4	29.0 \pm 2.9	ND	ND
	122	94.0 \pm 2.4	94.0 \pm 2.4		

Data (Injury %) represent mean \pm SE of 4 or 5 replicates. DAT, day after treatment; ND, not determined.

문에 광조건에서 singlet oxygen이 발생된다 (Böger and Wakabayashi 1997). 약제처리시 매우 빠른 속도로 막 과산화 (membrane peroxidation)가 일어나 잎이 탈색되면서 위조 고사된다. Oxyfluorfen처리의 경우에서도 WT와 CA간에 증상발현 속도 또는 제초활성 정도의 차이는 관찰되지 않았다 (Table 1, Figure 1). Glyphosate는 방향족 아미노산 생합성 과정의 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase를 저해하는 화합물이다 (Ream et al. 1988). 이는 엽록체에서 작용하지만 살초기작에 산화 스트레스와는 관련이 적을 것으로 생각되기 때문에 약제처리로 인한 반응 차이는 없을 것이다. 예상한 바와 같이 glyphosate 처리로 인한 WT와 CA간에 증상발현 속도 또는 제초활성 정도의 차이는 관찰되지 않았다 (Table 1, Figure 1). 이상의 결과를 보아 SOD/APX가 과대발현 될 경우, PS I에서 발생하는 산화스트레스에 대해서만 주로 작용을 하여 CA 식물의 항산화 반응은 PQ에 특이적이었다. Thomas 등 (1998)도 FeSOD가 결핍된 시아노박테리아는 PQ에 의해 유도된 산화스트레스에 대해서는 민감하게 반응을 나타내었지만 norflurazone에 의해 유도된 스트레스에 대해서는 둔감하였다고 하였다.

담배의 엽위별 paraquat 처리에 대한 반응

산화스트레스에 대한 감수성에 있어서 발육단계별 차이는 항산화 수준과 관련이 있다 (Donahue et al. 1997). 보통의 식물에서 항산화 반응은 생육단계에 따라 다르며 어린 조직에서는 상대적으로 강하고 늙은 조직에서는 약한 것으로 알려져 있다 (Asada et al. 1977). 따라서 PQ처리에 의한 제초활성 경감효과가 처리 당시의 잎의 생육단계에 따라 다르게 나타나는지를 조사하여 보았다. 약제처리 당시 6~7엽기 식물을 가지고 실험한 결과, 조사 당시에 위로부터 6번째 내외의 잎 (제초제 처리 당시 위로부터 3~4번째의 잎)에서 PQ에 대한 내성차이가 46.2%로서 상대적으로 보다 뚜렷하게 나타나는 경향이었다 (Figure 2). 약제처리 당시 9엽기 식물을 가지고 실험한 경우에서도 같은 결과를 얻었다 (테이타 제시 생략). 이는 CA식물에서 잎 분화 발달시기부터 항산화 증진 효과가 나타나지만 약제처리 당시 생장이 활발히 일어나는 잎에서 가장 높은 효과가 발현됨을 보여준다 (Alscher et al. 1997).

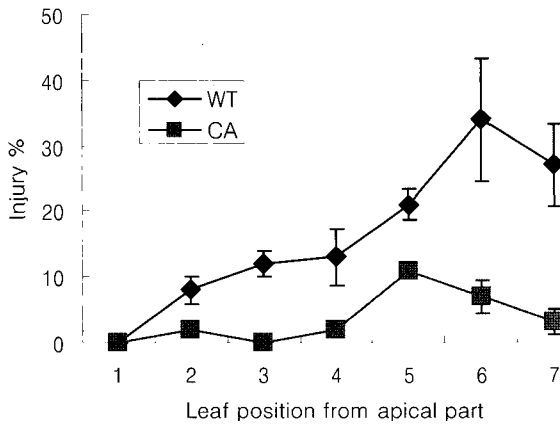


Figure 2. Differential responses to paraquat at different positioned leaves of SOD/APX-overexpressed (CA) and wild type (WT) tobacco. Injury % was determined at 5 day after herbicide treatment.

약광에서의 paraquat와 diuron에 대한 반응

이상의 실험은 광합성 과정이 매우 활발히 일어날 수 있는 온실조건에서 실시되었다. 이 경우, 약제 처리로 인해 많은 양의 활성산소가 식물체가 지닌 소거 능력 이상으로 일시에 발생되기 때문에 WT와 CA간의 반응차이가 없거나 낮게 나타났는지 모른다. 만일 약광 조건에서 실험한다면 광합성 속도가 낮고 느려서 온실조건 실험결과와는 다른 양상을 보여줄지 모른다. PS II 저해제 diuron과 PS I 저해제 PQ를 가지고 실험한 결과, diuron 처리의 경우 온실조건에서와 마찬가지로 CA와 WT간의 반응차이는 관찰되지 않았다 (Figure 3). 반면에 PQ의 경우에는 CA와 WT간의 반응차이가 있었지만 강광, 고온의 온실조건에서 실험했을 때 (Table 1)와 비교하여 볼 때, 내성차이가 증가되지 않는 경향이였다.

Paraquat와 ascorbic acid 혼합처리간의 반응

엽록체 내에서 발생한 hydrogen peroxide는 APX에 의해 소거된다. 이 반응에는 환원제로서 ascorbate가 사용되며

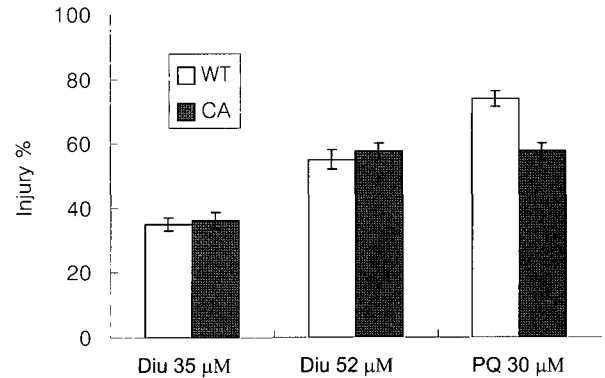


Figure 3. Herbicidal responses to paraquat of SOD/APX-overexpressed (CA) and wild type (WT) tobacco in the growth chamber (continuous temp. at 28°C, 70 μmol m⁻² s⁻¹, 14 h photoperiod). Injury % was determined at 5 day after herbicide treatment.

dehydroascobate 또는 monodehydroascobate는 각각 DHAR 또는 MDAR에 의해 ascorbate로 전환된다 (Alscher et al. 1997). Mano 등 (2001)에 의하면 PQ에 의해 유도된 photooxidative stress의 제1차 작용점은 chloroplastic ascorbate peroxidase라고 하였다. CA 담배에서는 APX가 과대 발현되기 때문에 ascorbate가 추가로 공급되면 항산화 효과가 더욱 증가될 것이라고 가설하고 PQ 용액에 ascorbic acid를 혼합하여 처리하여 보았다. 그 결과 PQ에 의한 약해가 ascorbic acid 처리에 의해 현저히 경감되는 경향이였다 (Table 2). 즉 WT에 60 μM의 PQ만을 처리하면 100% 고사되나 0.5, 5.0, 50 mM의 ascorbic acid를 혼합하면 각각 90%, 80%, 26.3%로 경감되었다. CA의 경우에서도 60 μM의 PQ 단독 처리시 95% 약해가 나타나지만 0.5, 5.0, 50 mM의 ascorbic acid를 혼합하면 각각 78.8%, 71.3%, 8.8%로 경감되었다. 이러한 ascorbate의 항산화 효과는 zeaxanthin 형성을 증가시키거나 (Leipner et al. 2000), PQ 처리에 의해 신속히 나타나는 APX 불활성화를 억제하거나 (Mano 2001) 아직 알려지지 않은 기타 작용 (May 2000) 때문인 것 같다. 전반적으로 ascorbic acid에 의한 회복 정도는 WT에 비해서 CA에서 약간 증가한 듯하나 유의성 있

Table 2. Effect of ascorbic acid on the herbicidal activity of CA and wild type tobacco plants treated with paraquat

Paraquat (μM)	Ascorbic acid (mM)	Injury % at 2 DAT	
		Wild type	CA
30	0	67.5±2.5	37.5±2.5
30	50	1.3±1.3	0.0±0.0
60	0	100±0.0	95.0±2.0
60	0.5	90.0±2.0	78.8±4.3
60	5.0	80.0±0.0	71.3±6.3
60	50	26.3±3.3	8.8±2.4

Data (Injury %) represent mean±SE of 4 replicates. DAT, day after treatment; CA, SOD/APX-overexpressed tobacco.

는 차이를 보이지 않았다. 이는 정상조건에서도 산화 스트레스 유도 제초제 처리에 의해 항산화효소가 어느 정도는 유도되기 때문일 수 있다 (Foyer 1994; Kurepa et al. 1997; Kim et al. 2004).

이상의 결과에 준하여 볼 때, CuZnSOD/APX의 과대발현은 PS I 에서 발생하는 산화스트레스에 대해서만 주로 작용하며, 다른 생리과정에 작용점을 가지는 제초제들에 의해 발생하는 산화 스트레스에 대해서는 소거역할을 크게 하지 못하는 것으로 판단되었다. 생화학과정에 준하여 볼 때 PS II 저해제와 카로티노이드 생합성 저해제 처리의 경우에 내성이 관찰되지 않은 것은 흥미로운 일이다. 왜냐하면 이들 약제는 엽록체 내에 hydrogen peroxide 농도를 증가시킬 것이기 때문이다. CA 담배에서 내성이 관찰되지 않았던 정확한 원인을 알기 위해서는 보다 정교한 실험체계에서의 추가적인 확인 연구가 필요할 것 같다. Oxyfluorfen에서 WT와 CA간에 반응 차이가 없었던 것은 다음과 같이 설명될 수 있을 것 같다. 즉 PPO 저해에 의해 증가된 protoporphyrinogen IX은 엽록체 외의 세포질로 분비되며 원형질막의 효소작용에 의해 PPIX으로 전환된다고 한다 (Retzlaff and Böger 1996; Böger and Wakabayashi 1997). 따라서 활성산소가 세포질에서 대량 축적되지만 이에 반해 과대발현된 SOD/APX는 엽록체 내에 존재하기 때문에 활성산소를 소거할 기회가 없었을 것이다.

이상의 결과는 우리들에게 다음과 같은 정보를 제공해 주고 있다. 첫째, PS II와 PS I 간의 항산화 시스템은 기능적으로 뚜렷하게 구별되는 것 같다. 즉 PS II의 경우에는 틸라코이드 막에 유입되어 있는 카로티노이드 또는 토코페롤이 항산화 작용에 크게 기여하는 반면, PS I에서는 SOD/APX와 같은 효소작용이 큰 역할을 할지 모른다. 따라서 환경복합내성 작물을 제작할 시에 이를 고려할 필요성이 있을 것 같다. 둘째, SOD/APX 과대 발현 시스템보다는 ascorbic acid 생산을 증대시키면 항산화 효과가 더욱 증가될 것 같다. 이는 APX 및 기타 항산화 효소 활성 자체가 활성산소의 공격으로 불활성화 되기 쉽기 때문이다 (Mano 2001). 셋째, 산화적 스트레스를 통해 살초 활성을 나타내는 여러 가지의 제초제들에 대해 보다 내성을 지닌 작물을 제작하고자 할 경우에는 화합물 작용기작별로 반응 특이성이 고려되어야 하며, 특히 세포질 및 세포막에서의 oxygen radical scavenger 기능을 강화시킬 수 있는 방안이 강구되어야 할 것 같다.

적 요

Superoxide dismutase와 ascorbate peroxidase가 동시에 과대발현된 담배(CA)를 가지고 여러 제초제들에 대한 항산화 반응을 조사하였다. 온실조건 실험에서, CA 담배는 PS

I 저해제로 알려진 paraquat처리에 대해서 내성이 인정되었고 그 정도는 40% 내외였다. PS II 저해제 (bromoxynil, diuron, bromacil), 엽록소 생합성 저해제 (oxyfluorfen), 카로티노이드 생합성 저해제 (fluridone)와 EPSP synthase 저해제 (glyphosate) 처리에서는 CA와 wild type간의 반응차이가 관찰되지 않았다. Paraquat와 diuron을 이용한 약광 조건의 실험에서도 온실조건의 실험결과와 유사한 정도로 paraquat처리에 대해서만 내성을 나타내었다. 온실조건에서의 엽위별 반응의 경우, 6 - 9 엽기 식물체에 paraquat를 처리하였을 때, 약제처리 당시 위로부터 3 - 4번째 전개되고 있었던 잎이 상대적으로 내성 정도가 높게 나타났다. 한편 paraquat 처리 시에 여러 농도의 ascorbic acid를 혼합할 경우, CA와 wild type 모두에서 비슷한 정도로 paraquat 활성을 경감시켰다. 결론적으로, CuZnSOD/APX의 과대발현은 photosystem I 에서 발생하는 산화스트레스에 대해서만 주로 작용하며, 다른 제초제들에 의해 발생하는 산화적 스트레스에 대해서는 소거 능력이 부족한 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 바이오그린 21사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol Plant* 100: 224-233
- Asada K, Takahashi MA, Tanaka K, Nakano Y (1977) Formation of active oxygen and its fate in chloroplasts. In: Hayashi O and Asada K (eds), *Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen*, Univ. Park Press, Baltimore, pp 45-62
- 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: 601-639
- Babbs CF, Pham JA, Coolbaugh RC (1989) Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol* 91: 1267-1270
- Bartosz G. (1997) Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Planta* 19: 47-64
- Böger P (1996) Mode of action of herbicides affecting carotenogenesis. *J Pesticide Sci* 21: 473-478
- Böger P, Wakabayashi K (1996) Peroxidizing herbicides (I): Mechanism of action. *Z Naturforsch* 50c: 159-166
- Donahue JL, Okpodu CM, Cramer CL, Grabau EA, Alscher RG (1997) Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiol* 113: 249-257

- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* 92: 696-717
- Frans R, Talbert R, Marx D, Crowley H (1986) Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: Camper ND (ed), *Research Methods in Weed Science*, Ed 3, Southern Weed Science Society, Champaign, pp 29-46
- Fuerst EP, Norman MA (1991) Interaction of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci* 39: 458-464
- Hess FD (2000) Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Sci* 48: 160-170
- Kim JS, Yun BW, Choi JS, Kim TJ, Kwak SS, Cho KY (2004) Death mechanisms caused by carotenoid biosynthesis inhibitors in green and in undeveloped plant tissues *Pestic Biochem Physiol* 78: 127-139
- Kim JS, Oh KH, Lee JA (2002) Mode of actions of herbicides inhibiting chloroplast function. In: Lee CH (ed), *Recent Trends in Natural Sciences: Photosynthesis and the Environmental Stress*, Vol. 1, Busan National Univ. Press, Busan, pp 147-165
- Koyama Y (1991) Structures and functions of carotenoids in photosynthetic systems. *J Photochem Photobiol B(Biol.)* 9: 265-280
- Kurepa J, Hrouart D, Montagu MV, Inzé D (1997) Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments. *Plant Cell Physiol* 38: 463-479
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environm* 25: 873-882
- Lee DL, Prisbylla MP, Cromartie TH, Dagarin DP, Howard SW, Provan WM, Ellis MK, Fraser T, Mutter LC (1997) The discovery and structural requirements of inhibitors of *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Weed Sci* 45: 601-609
- Leipner J, Stamp P, Fracheboud Y (2000) Artificially increased ascorbate content affects zeaxanthin formation but not thermal energy dissipation or degradation of antioxidants during cold-induced photooxidative stress in maize leaves. *Planta* 210: 964-969
- Mano J, Ohno C, Domae Y, Asada K (2001) Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. *Biochim Biophys Acta* 1504: 275-287
- May JM (2000) How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction ? *Free Radical Biol Medicine* 28: 1421-1429
- Ream JE, Steinrucken HC, Porter CA, Sikorski JA (1988) Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from dark-grown seedlings of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol* 87: 232-238
- Retzlaff K, Böger P (1996) An endoplasmic reticulum plant enzyme has protoporphyrinogen IX oxidase activity. *Pestic Biochem Physiol* 54: 105-114
- Rutherford AW, Krieger-Liszkay A (2001) Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem Sci* 26: 648-653
- Siefermann-Harms D (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol Planta* 69: 561-568
- Thomas DJ, Avenson TJ, Thomas JB, Herbert SK (1998) A cyanobacterium lacking iron superoxide dismutase is sensitized to oxidative stress induced with methyl viologen but is not sensitized to oxidative stress induced with norflurazon. *Plant Physiol* 116: 1593-1602

(접수일자 2005년 5월 10일, 수리일자 2005년 5월 31일)