

## Protoporphyrinogen Oxidase 저해형 제초제 Oxyfluorfen에 대한 호박 엽령별 내성기작

국용인<sup>1\*</sup>, 윤영범

## Mechanism of Protoporphyrinogen Oxidase-inhibiting Herbicide, Oxyfluorfen Tolerance in Squash leaves of Various Ages

Yong In Kuk<sup>1\*</sup> and Young Beom Yun

**ABSTRACT** Differential tolerance to protoporphyrinogen oxidase (Protox)-inhibiting herbicides, oxyfluorfen was observed between leaf ages in squash. Physiological responses to oxyfluorfen, including leaf injury, cellular leakage, accumulation of tetrapyrroles, and antioxidative enzymes activity, were investigated in leaf age classes of squash to identify mechanisms of oxyfluorfen tolerance. Leaf 1, 2, and 3 injuries for Joongangaehobak were >10,000, 1,286, and 1.6-fold higher than that of leaf 4, after treatment of oxyfluorfen. On the other hand, leaf 1, 2, and 3 injuries for Sintowjahobak were 725, 366, and >0.6-fold higher than that of leaf 4, after treatment of oxyfluorfen. However, in contrast to oxyfluorfen treatment results, leaf injury of squash leaf 4 treated with paraquat was much smaller than in leaves 1, 2 and 3. Electrolyte leakage from the tissues treated with oxyfluorfen was higher in the youngest leaf (Leaf 4) than in the older leaves 1, 2, and 3. Differential leaf response to oxyfluorfen of squash appears to be due in large part to differences in protoporphyrin IX (Proto IX), Mg-Proto IX, and Mg-Proto IX monomethyl ester accumulation in treated leaves. In contrast, leaf 4 had higher activities of superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase than leaf 1 after treatment with oxyfluorfen. However, the induction in antioxidant activity in leaf 4 was not enough to overcome the toxic effects of a Protox inhibitor, oxyfluorfen, so the leaf eventually died.

**Key words:** antioxidative enzymes; leaf age; oxidative stress; oxyfluorfen; paraquat; protoporphyrinogen oxidase; squash.

<sup>1</sup> 순천대학교 생명산업과학대학 자원식물개발학과, 540-742 전남 순천시 중앙로 413(Dept. of Development in Resources, College of Life Science and Natural Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea).

\* 연락저자(Corresponding author) : Phone) +82-61-750-3286, Fax) +82-61-750-3280, E-mail) yikuk@suncheon.ac.kr

(Received May 28, 2010; Examined June 16, 2010; Accepted June 23, 2010)

## 서 언

Diphenyl ether(DPE)계의 대표적인 제초제 oxyfluorfen과 oxadiazole계 제초제인 oxadiazon 뿐만 아니라 pyrazole phenyl ether, *N*-phenyl imide계 제초제들도 DPE계 제초제와 동일하게 광상태하에서 식물체의 급격한 탈수와 탈색을 유기시켜 식물체를 고사케 하는 것으로 알려져 있다(Duke 등 1991; Scalla와 Matringe 1994). 이들 제초제의 작용점은 porphyrin 생합성 과정에서 protoporphyrinogen IX(Proto IX)이 protoporphyrin IX(Proto IX)로 산화되는 과정에 공통적으로 작용하는 protoporphyrinogen oxidase(Protox)으로 알려져 있다(Duke 등 1991; Jacob 등 1996; Matringe 등 1989; Witkowski와 Halling 1989). DPE계 제초제를 비롯한 Protox 저해형 제초제에 의해 Protox 효소가 저해되면 이 효소의 기질인 Proto IX이 색소체의 외막에 축적하지 못하고 원형질막으로 이동하여 원형질막의 Protox 유사효소에 의해 광활성 물질인 Proto IX이 과다 축적되고, 이러한 Proto IX은 광상태하에서 분자산소로부터 일중항산소( $^1O_2$ )을 발생시켜 세포막의 지질과산화작용을 일으켜 결과적으로 식물체를 죽게 한다(Becerril and Duke 1989; Duke 등 1991; Matringe 등 1989; Sherman 등 1991).

Protox 저해형 제초제중 현재까지 여러 가지 DPE계 제초제가 발견되었으나 제초제의 선택성 폭이 매우 좁아 이들 제초제는 주로 과수 재배지에서 국부처리용 제초제로 사용되고 있는 실정이다. 그러나 벼를 비롯한 밀 등은 DPE계 제초제인 oxyfluorfen에 상대적으로 내성을 보여 식물 종간에 내성 차이가 존재함을 알 수 있다(구와 국 1997; 국과 구 1996; 국과 구 1997; Choi 등 1999; Sherman 등 1991). 또한 oxyfluorfen에 대한 내성 차이가 종내 벼 품종간에도 존재함이 보고되었다(국 등 1996; 최 등 1996; Guh 등 1988). 한편 동일 개체 내에서도 oxyfluorfen에 대한 내성차이가 담배, 밀, 보리 등의 엽령에 따라서도 내성 차이를 보인다고 보고하였다(국 등 2003, 이 등 1998). 이러한 종간, 종내 및 동일 개체내 엽령간 내성차이는 다양한 기작에 의해 나타날 수 있다. 예를 들면, 잎 표면 구조의 특성에 따라 제초제에 대한 내

성차이를 보일 수 있다고 하였다(Pereira 등 1971; Wilkinson 1980). 즉, 잎 표면에 특성 차이는 제초제 흡수정도에 영향을 미친다. Oxyfluorfen에 내성 벼 품종이 감수성 품종에 비해 흡수량은 적으나 이행은 두 품종 모두 극히 제한적이고 차이가 없다고 한 반면(Guh 등 1988)에 oxyfluorfen에 상대적으로 내성인 밀은 보리에 비해 흡수량에는 차이가 없었으나 이행은 보리가 밀보다 많은 것으로 보고되었다(Chun 등 2001). Acifluorfen과 phenyl triazolinone계 제초제에 내성인 콩이나 fluorodifen에 내성인 땅콩은 이들 제초제의 신속한 대사 때문에 내성이 발현된다고 하였다(Eastin 1971; Frear 등 1983). 또한 포르피린 생합성 과정에서 Proto IX 축적은 Protox 활성의 억제에 의해 기인되는데 acifluorfen에 내성인 겨자는 감수성인 어저귀에 비해 Protox 활성저해가 적고, Proto IX 축적량이 적다고 하였으며(Sherman 등 1991), oxyfluorfen에 상대적 내성인 밀이 보리에 비해 Protox 활성저해와 Proto IX 축적량이 적다고 하였다(Choi 등 1999). 이러한 경향은 벼 품종간 내성차이(국 등 1996; Lee 등 1992)와 동일 개체내 담배 엽령간 내성차이(국 등 2003)에 관한 연구에서도 볼 수 있었다. DPE계 제초제에 의해 Protox 효소가 저해되면 Proto IX이 축적되는데, 축적된 Proto IX은 광상태하에서 일중항산소를 발생하여 식물체를 죽게 한다(Haworth and Hess 1988). 그러므로 일중항산소를 무독화 할 수 있는 vitamin C와 E같은 항산화제와 superoxidase dismutase(SOD), catalase(CAT)와 같은 항산화효소의 활성 차이에 의해 Protox 저해형 제초제에 대한 종간, 종내 및 동일 개체내 엽령간 내성차이가 존재할 것으로 가정할 수 있다. 실제로 Finckh와 Kunert(1985)는 oxyfluorfen에 의한 지질과산화가 vitamin C와 E의 비율이 적당할 때(10-15 : 1) 피해가 감소된다고 하였고, 그 총량도 약제에 대한 내성과 관련이 있다고 보고하였다. Protox 저해형 제초제에 내성인 벼 품종과 동일 개체내 엽령간 내성차이의 경우, oxyfluorfen을 처리하면 SOD와 같은 항산화효소 활성이 감수성 품종 또는 상대적 내성 감수성 엽에 비해 증대 된다고 하였다(국 등 2003; 최 등 1996). 또한 oxyfluorfen 처리에 의한 좁개구리밥의 피해는  $\alpha$ -tocopherol, mannitol 및 hydroquinone의 전

처리로 경감되는 것으로 보고된 바 있다(Matsumoto 등 1990).

비록 식물종간, 식물 종내 및 동일 개체 내에 존재하는 Protox 저해형 제초제에 관한 내성기작의 연구가 되었을지라도 호박 엽령간에 존재한 내성차이에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 Protox 저해형 제초제중 oxyfluorfen에 대해 엽령간 뚜렷한 내성차이를 보인 호박 품종을 선발하여 이들 엽령간 피해정도와 세포내 구성물질의 누출을 조사하고, Protox 저해형 제초제와 작용기작이 다른 paraquat 처리시 호박 엽령간 반응을 조사하였다. 또한 Protox 저해형 제초제에 대한 엽령간 내성차이에 관한 기작을 포르피린 생합성경로의 중간물질인 Proto IX 등의 축적정도 및 항산화 효소 등을 조사하여 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

예비 실험을 통하여 18개 호박 품종 중에 oxyfluorfen에 엽령간 내성차이가 뚜렷한 호박 2품종(중앙애호박, 신토좌)의 종자를 선발하였다. 이들 종자를 24시간 동안 물에 침지 시킨 후 플라스틱 육묘용 상자(50×30×7 cm)에 원예용상토(홍농바이오 상토)를 충전하고 침지한 종자를 파종하여 30/20℃ (주/야)의 온도조건과 16시간의 일장조건의 성장상에서 발아시킨 후 균일한 발아세를 보인 호박만 포트(500ml)로 이식하여 주/야간 30±3/20±3℃의 온실조건에서 4엽까지 성장시켰다. 4엽까지 전개된 호박에 oxyfluorfen (23.5% EC)을 0, 10, 100, 1,000 및 10,000µM이 되도록 조제하여 충분히 제초제가 흡수되도록 분무하였다. 분무 후 처리액이 충분히 흡수되도록 4시간 암상태에 둔 후 성장상(주/야 30/20℃, 250µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)으로 옮겨 2일 후 엽령간 피해정도를 달관평가 하였다(0~100%, 0; 약해무, 100; 완전고사). Oxyfluorfen 처리시 1, 2, 3엽은 잎이 완전전개 되었고, 4엽은 50% 전개되었다. 본 실험은 3반복으로 동일한 실험을 2회 수행하였다. 엽령간 내성 차이를 알아보기 위

하여 아래와 같은 방정식을 이용하여 I<sub>50</sub>을 구하였다.

$$y = y_0 + a * \exp(-b * x)$$

Oxyfluorfen과 작용기작이 다른 paraquat(24.5% SL)를 100, 200, 300 및 500µM로 조제하여 4엽이 전개된 호박에 살포하고 처리 후 24시간에 달관평가에 의해 잎 피해정도를 조사하였다. 그 밖의 실험방법은 위의 oxyfluorfen 실험과 동일하게 수행하였다.

### 세포내 전해물질의 누출

위의 온실조건에서 생육시킨 4엽이 전개된 호박을 엽령별로 수확하여 cork borer를 이용하여 엽절편(4mm 직경)을 만들고 각각 0.1g씩 1% sucrose/1mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid buffer(pH 6.5)가 5ml 담겨져 있는 Petri dish(6cm 직경)에 옮긴 후 oxyfluorfen(100%)의 최종농도가 100µM되도록 하였다. Oxyfluorfen을 처리한 엽절편을 25℃의 성장상에서 12시간 암배양한 다음 250µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>의 광을 조사하여 전기전도계(Horiba, B-173)를 이용하여 2시간 간격으로 12시간까지 전해물질의 누출 정도를 측정하였다.

### 포르피린 생합성 중간물질 축적량

4엽이 전개된 호박을 oxyfluorfen 0, 10, 100, 1,000 µM을 처리하고 위의 세포내 전해물질의 누출 실험과 동일하게 암상태에서 12시간 배양한 후 6시간 광에 노출 후 각각 1엽과 4엽을 0.1g 채취하여 막자사발에 넣고 2ml의 methanol : acetone : 0.1 N NaOH (9 : 10 : 1, v/v) 추출용액으로 마쇄한 다음, 4℃의 온도에서 10,000g의 속도로 10분간 원심분리하여 상정액을 취하고 나일론 필터(0.2µm pore size)로 거른 후 사용하기 전까지 -70℃의 냉동고에 보관하였다. Porphyrin은 NovaPak C<sub>18</sub> column(4-µm particle size, 4.6×250mm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용한 HPLC로 분석하였다. HPLC는 형광검출기로 methanol과 0.1M ammonium phosphate(pH 5.8)의 이동상(1ml min<sup>-1</sup>)을 이용하여 Proto IX는 여기 및 형광 파장을 각각 400과 630nm에서 그리고 Mg-Proto와 Mg-Proto Me는 415와 595nm에서 측정하

였다. 이들 물질들은 표준물질과 비교하여 정량화하였다(Lermontova와 Grimm 2000).

### 항산화효소 활성

4엽까지 전개한 호박잎에 oxyfluorfen 0, 10, 100, 1,000 $\mu$ M이 되도록 처리하여 암상태에 12시간 배양하고 광에 24시간 노출 후 각 엽령별로 0.5g 씩 채취하여 분석 전까지 -70 $^{\circ}$ C의 냉동고에 보관하였다. 각 1엽과 4엽의 잎을 액체질소를 이용하여 마쇄한 다음 2mM EDTA, 1% PVP-40 및 1mM PMSF가 첨가된 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.5) 3ml로 균질화하여 15,000g로 20분간 원심분리한 다음 상층액을 항산화효소 활성 측정에 사용하였다. Ascorbate peroxidase(APX) 경우 위의 추출 buffer에 10mM ascorbate를 첨가하였고, SOD 활성은 조효소액을 PD-10 column에 여과시킨 후 사용하였다. SOD의 활성은 0.1mM EDTA, 0.015mM ferricytochrome C, 0.05mM xanthine이 첨가된 50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> buffer(pH 10.2)를 사용하였다. SOD 활성은 550nm에서 1분당 0.025 정도로 흡광도가 증가될 수 있도록 충분한 양의 xanthine oxidase와 조효소액을 넣어 흡광도 감소율로 활성을 측정하였다(Spychalla and Desborough 1990). SOD 활성의 단위는 cytochrome C의 환원이 50% 저해되는 데 필요한 조효소의 양을 기준으로 하여 계산하였다. CAT 활성은 Mishra 등 (1993)의 방법에 의해 측정하였고, 반응액은 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)와 11mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 하였다. CAT 활성은 효소 추출액을 넣고 240nm에 1분간 흡광도 변화로 측정하였다. POX 활성은 효소 추출액을 넣고 470nm에서 guaiacol 발생량으로 측정하였다(Egley 등 1983). APX의 활성은 ascorbate의 산화 정도를 290nm에서의 흡광도 감소로 측정하였고(Chen and Asada 1989), APX의 반응액은 0.5mM ascorbate와 0.2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 첨가된 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)이었다. Gluthathione reductase (GR)의 활성은 Rao(1996)의 방법에 따라 2mM EDTA, 0.2mM NADPH 및 0.5mM GSSG가 첨가된 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.8)에 조효소액을 넣어 반응시킨 후 340nm에서 분당 흡광도 감

소로 조사하였다. 단백질 함량의 측정은 Bradford (1976)의 방법에 준하여 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### Protox 저해형 제초제 Oxyfluorfen에 대한 호박 엽령별 내성 차이

Protox 저해형 제초제인 oxyfluorfen에 대한 호박 엽령간 내성 차이를 알아보기 위해 호박 18 품종 중에서 엽령간 내성차이가 뚜렷한 2품종을 최종 선발하였다(자료 미제시). 이들 선발된 2품종(중양애호박, 신태좌)의 종자를 파종하여 4엽이 전개되었을 때 oxyfluorfen을 처리하였다(그림 1). 중양애호박 품종의 경우, 1 $\mu$ M oxyfluorfen를 경엽처리 하였을 때 제일 상위엽(4엽)과 3엽에서는 약 50% 이상의 잎 피해

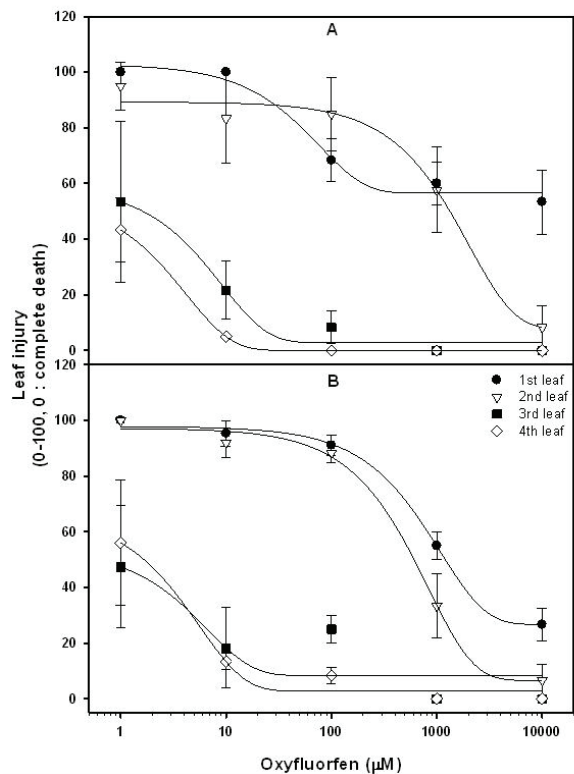


Fig. 1. The effect of leaf age on the response of two squash cultivars (A; Joongangaehobak, B; Sintowjahobak) to oxyfluorfen. Plants were sprayed at the four-leaf stage, incubated in the dark for 4 h, and exposed to light to 48 h.

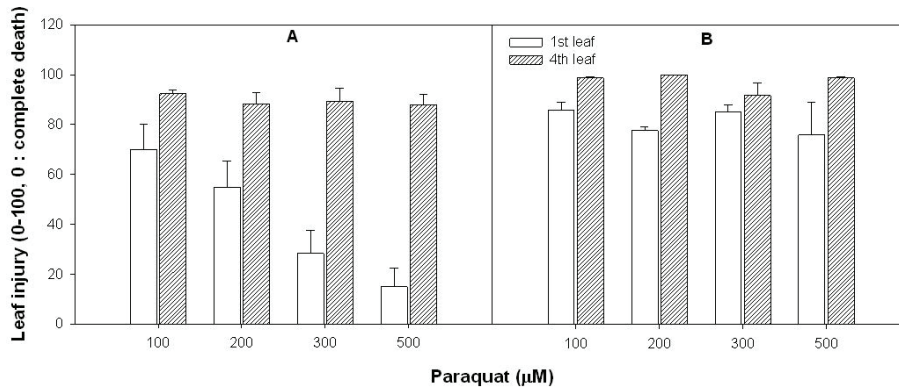


Fig. 2. The effect of leaf age on the response of two squash cultivars (A; Joongangaehobak, B; Sintowjahobak) to paraquat. Plants were sprayed at the four-leaf stage, incubated in the dark for 4 h, and exposed to light to 24 h.

를 보였고, 10μM 이상의 농도에서는 잎이 거의 고사하였다. 그러나 상대적으로 1엽과 2엽에서는 1,000μM 이상의 처리에서도 단지 40% 정도 밖에 잎의 피해가 나타나지 않았다. 또한 1엽에서는 10,000μM에서도 40% 정도의 피해 밖에 나타나지 않아 다른 엽에 비해 높은 내성을 보였다. 엽령간 oxyfluorfen에 대한 내성정도는 1 > 2 > 3 = 4엽 순으로 나타났다. 신토좌에서도 중앙애호박 품종처럼 하위엽(1, 2엽)보다는 3, 4엽에서 피해 정도가 컸고, 두 품종의 엽령간 피해정도 차이는 크지 않았다. 그림 1의 두 품종의 엽령별 잎의 피해정도에 대한 자료를 이용하여 회귀

식을 구하고 그 회귀식에 근거하여 산출한 엽령별 I<sub>50</sub>은 표 1과 같다. 즉, 중앙애호박의 경우 1, 2, 3엽은 4엽에 비해 각각 >10,000, 1,286, 1.6배 내성을 보였다. 신토좌의 경우는 중앙애호박에 비해 엽령간 내성 차이가 다소 적었지만, 신토좌 품종의 경우도 1, 2, 3엽이 4엽에 비해 각각 725배, 366, <0.6배의 내성을 보였다. 이들 엽령간 뚜렷한 차이가 oxyfluorfen과 작용기작이 다른 paraquat에서도 유사한 경향을 보이는지 알아보하고자 4엽이 전개된 호박엽에 paraquat를 처리하였다(그림 2). Paraquat 처리에서도 엽령간 반응 차이를 보였으나 oxyfluorfen에서 보인 엽령간 반응

Table 1. I<sub>50</sub> values for leaf injury response of two squash cultivars treated with oxyfluorfen.

Cultivar	Leaf age	Regression equation <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	I <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)	Relative tolerance <sup>c</sup>
Joongangaehobak	1	$y = 56.52 + 46.33 * e^{(-0.013x)}$	0.98	> 1,000	> 10,000
	2	$y = 7.76 + 81.52 * e^{(-0.0005x)}$	0.99	1,286	1,286
	3	$y = 2.78 + 56.40 * e^{(-0.1094x)}$	0.98	1.59	1.59
	4	$y = -0.0000000069715 + 55.08 * e^{(-0.2399x)}$	0.99	< 1.00	< 1
Sintowjahobak	1	$y = 26.70 + 71.13 * e^{(-0.0009x)}$	0.99	1,197	725
	2	$y = 6.57 + 90.64 * e^{(-0.0012x)}$	0.99	604	366
	3	$y = 8.33 + 45.37 * e^{(-0.1512x)}$	0.73	< 1.00	< 0.6
	4	$y = 2.78 + 63.70 * e^{(-0.1798x)}$	0.98	1.65	1

<sup>a</sup>Regression equation generated using herbicide concentration in μM.

<sup>b</sup>I<sub>50</sub> values were the oxyfluorfen concentrations that reduced visual leaf injury by 50%.

<sup>c</sup>Relative tolerance values were calculated based on the ratio of I<sub>50</sub> values of older leaves (Leaves 2, 3, and 4) to the youngest leaf (Leaf 1).

과는 상반된 경향을 보였다. 즉, 중앙애호박의 경우 최상위엽인 4엽의 경우, paraquat 처리 농도가 증가하더라도 잎에 대한 피해정도는 크지 않았다. 반면에 최하위엽인 1엽은 처리 농도가 증가할수록 피해정도가 커지는 경향을 보였다. 한편 신토좌의 경우에서도 4엽이 1엽에 비해 내성정도가 큰 것으로 나타났으나 중앙애호박처럼 뚜렷한 차이는 보이지 않았다.

Oxyfluorfen에 대한 내성은 밀과 보리의 식물종간(구와 국 1997; 국과 구 1996; 국과 구 1997; Choi 등 1999; Sherman 등 1991)에 차이가 있을 뿐만 아니라 벼 품종간(국 등 1996; 최 등 1996; Guh 등 1988) 또는 밀, 보리 품종간에도 차이를 보인다(구와 국 1997). 또한 동일 식물체내의 담배 엽령간(국 등 2003; 이 등 1998) 그리고 밀, 보리 엽령간에 따라 oxyfluorfen에 대한 내성차이가 존재하는 것으로 보고된 바 있다(손 2007). 일반적으로 제초제뿐만 아니라 저온과 같은 환경스트레스에 대해서도 성숙한 잎보다 어린잎에서 피해가 심하다. 그러나 본 연구 결과에서와 같이 동일 개체내의 4엽과 1엽의 차이가 종간 및 종내에서 볼 수 있는 차이보다 큰 것으로 나타났다. 반면에 일부 완두(Donahue 등 1997), 오이(Kuk 등 2006) 연구에서는 어린엽이 상대적으로 성숙엽에 비해 paraquat에 상대적으로 내성을 보였다. 또한 손(2007)은 밀과 보리에서도 어린엽이 성숙엽에 비해 oxyfluorfen에 내성임을 보고 하였다. 본 연구에서 보인 paraquat에 대한 호박 엽령간 내성 차이에 관한 기작은 추후에 검토할 예정이다.

결론적으로 본 연구에 사용된 호박 품종(중앙애호박, 신토좌)은 동일 개체내에서 엽령별 확실한 내성차이를 보이고 있어 종간이나 품종간에 보이는 유전적 차이를 배제할 수 있기 때문에 새로운 화합물의 Protox 저해형 제초제에 대한 내성기작을 연구하는데 좋은 재료로 이용될 수 있으리라 본다.

### Oxyfluorfen 처리에 따른 호박 엽령간 생리적 반응차이

Oxyfluorfen 처리에 따른 호박 엽령별 전해물질의 누출은 처리 후 광노출 시간이 경과됨에 따라 증대되었다(그림 3). 호박잎에 대한 oxyfluorfen에 대한 효과는 두 품종 모두 광 노출 후 4시간째까지는 엽령간

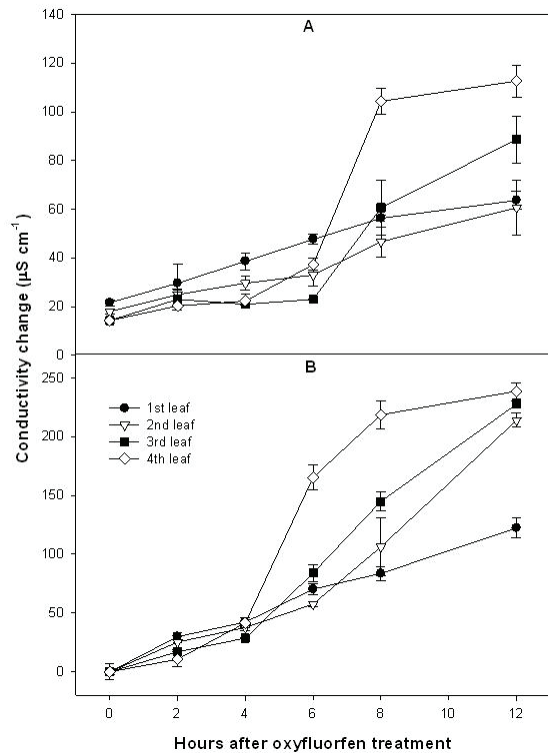
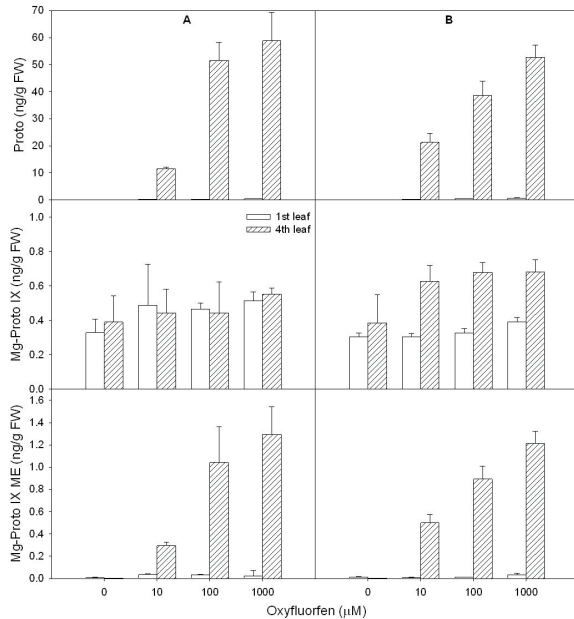


Fig. 3. Effect of 100  $\mu$ M oxyfluorfen on conductivity change from the four different age classes of squash plants (A; Joongangachobak, B; Sintowjahobak).

차이가 적었으나 그 이후부터는 엽령간에 큰 차이를 보였다. 즉 어린잎일수록 전해물질의 누출이 훨씬 많았다. 따라서 세포내 전해물질의 누출도 엽령간 잎의 피해정도와 유사하게 최상위 엽일수록 크게 나타났다.

### 호박엽령에 따른 Oxyfluorfen 내성기작

DPE계 제초제인 oxyfluorfen의 작용기작은 색소체의 외막에 있는 Protox 효소가 oxyfluorfen에 의해 저해되면 이 효소의 기질인 Protogen IX이 색소체 바깥으로 이동된 후 원형질막에 존재하는 제초제 내성의 Protox 유사효소에 의해 Proto IX으로 산화되며 이 Proto IX으로부터 일중산소가 발생되어 원형질막이 파괴되는 것으로 알려져 있다(Lee와 Duke 1994). 이러한 작용기작으로 볼 때 Protox 효소 자체가 내성이거나 Proto IX의 축적량이 적거나 또는 Proto IX으로부터 발생하는 일중산소를 무독화시키는 능력이 엽령별로 달라서 내성을 보일 것으로 추측할 수 있다. 따라서 oxyfluorfen 처리 후 포스포린 생합성과정의 중



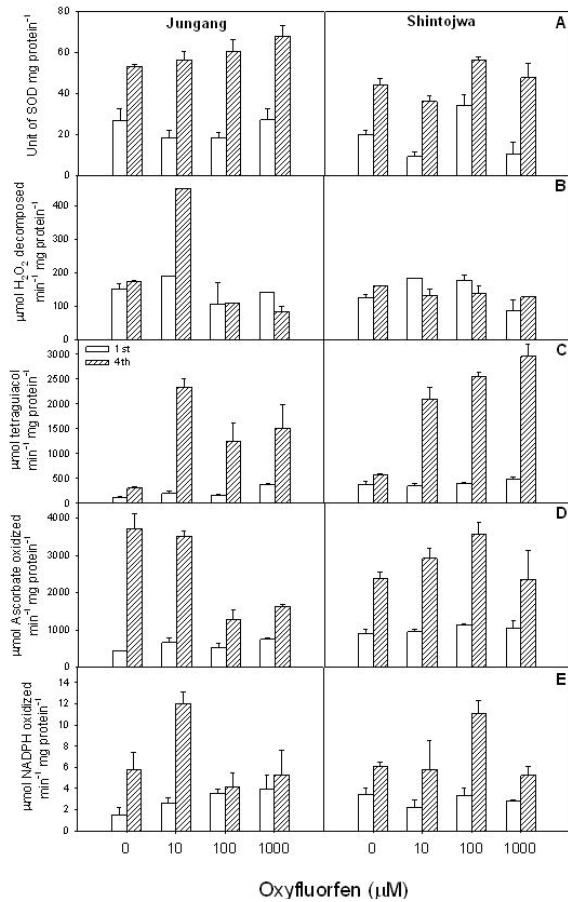
**Fig. 4.** Effect of oxyfluorfen on accumulation of tetrapyrroles in two different age classes of squash plants after 6 h of exposure in light (A; Joongangaehobak, B; Sintowjahobak).

간물질을 엽령별로 측정하였다(그림 4). Oxyfluorfen 처리에 따른 호박 엽령별 Proto IX의 축적은 중앙에 호박의 경우, 1엽에서는 처리농도가 증가하더라도 축적량이 아주 적었다. 그러나 4엽의 경우는 1엽에 비해 약 10~58배 축적되었다. 신토좌의 경우도 1엽은 거의 축적되지 않았고, 4엽에서는 처리농도가 증가할수록 증가하여 4엽이 1엽에 비해 약 19~53배 축적되었다. Mg-Proto IX의 축적은 중앙에 호박에서는 1엽과 4엽간 그리고 처리농도 간에 차이를 보이지 않았다. 그러나 신토좌의 경우 4엽이 1엽에 비해 약 2배 이상 축적량을 보였으나, 처리농도가 증가하더라도 축적량 증가는 보이지 않았다. 또 다른 포르피린 생합성 경로 중간물질인 Mg-Proto IX monomethyl ester 경우는 Proto IX의 축적처럼 1엽과 4엽간에 큰 차이를 보였다. 즉 중앙에 호박과 신토좌 호박의 경우 10~1,000 $\mu$ M 처리에서 4엽이 1엽에 비해 각각 20~120배와 40~110배 축적량이 많았다.

일반적으로 oxyfluorfen 처리에 의한 과도한 Proto IX의 축적은 전해물질의 누출, 엽록소 함량 감소 및 지질과산화에 원인이 되는 것으로 보고되고 있다

(Becerril and Duke 1989; Sherman 등 1991). 따라서 본 연구결과에서 4엽이 1엽에 비해 전해물질의 누출이 상대적으로 많아 oxyfluorfen에 대한 엽령간 내성차이는 Proto IX의 축적과 긴밀한 관련이 있음을 추론할 수 있다. 또한 Proto IX 이외의 포르피린 생합성 경로의 중간물질인 Mg-Proto IX과 Mg-Proto IX monomethyl ester 축적량으로 Prottox 저해 제초제 oxyfluorfen에 대한 내성을 설명할 수 있다. Sherman 등 (1991)은 Prottox 저해제에 상대적으로 내성인 겨자가 다른 감수성 식물(명아주, 비름, 어저귀 등)에 비해 Prottox 저해제 처리로 인해 Proto IX의 축적량이 적다고 하였다. 한편 다른 연구에서도 포르피린 생합성 경로의 중간물질 축적량과 Prottox 저해 제초제에 대한 내성과 상관관계가 있다고 하였다(Becerril and Duke 1989; Chun 등 2001; Jacobs and Jacobs 1993; Jacobs 등 1996; Lee와 Duke 1994). 그러나 Lee 등 (1992)은 각 식물종간에 Proto IX의 축적이 다르며, oxyfluorfen 처리에 의한 제초제의 피해정도가 조직에 축적된 Proto IX와 항상 관련이 있는 것은 아니라고 보고하였다.

Prottox의 저해에 의해 축적된 Proto IX은 광상태하에서 일중항산소를 발생하여 식물체를 죽게 한다(Duke 등 1991; Haworth와 Hess 1988). 따라서 일중항산소를 무독화 할 수 있는 항산화효소의 활성과 oxyfluorfen에 내성과의 관련성이 있는지를 조사하였다(그림 5). 중앙에 호박의 경우 무처리 상태의 엽령별 항산화 효소는 CAT를 제외한 SOD, POX, APX 및 GR에서 4엽이 1엽보다 약 2, 2, 5 및 2.5배 높은 활성을 보였다. 4엽에서 SOD 활성은 1엽에 비해 oxyfluorfen 처리로 약 3배 이상 증가하였다. 또한 4엽의 경우 oxyfluorfen 처리 농도가 증가할수록 무처리에 비해 증가하는 경향을 보였으나 1엽은 오히려 감소하거나 또는 비슷한 양상을 보였다. 4엽에서 CAT 활성의 경우 10 $\mu$ M oxyfluorfen 처리에서만 1엽에 비해 약 2.5배 높았을 뿐 100, 1,000 $\mu$ M에서는 같거나 오히려 낮은 경향을 보였다. POX 활성의 경우 1엽에서는 oxyfluorfen 처리농도가 증가하더라도 활성유도가 없었으나, 4엽의 경우는 10, 100, 1,000 $\mu$ M 처리에서 1엽에 비해 각각 약 15, 8, 6배 높은 활성을 보



**Fig. 5.** Effect of oxyfluorfen on (A) superoxide dismutase, (B) catalase, (C) peroxidase, (D) ascorbate peroxidase, and (E) glutathione reductase activities. Four-leaf plants treated with oxyfluorfen were harvested at 24 h of exposure in light.

었다. 1엽과 4엽의 APX 활성은 oxyfluorfen 처리로 인해 무처리에 비해 같거나 감소한 경향을 보였다. 그러나 4엽은 1엽에 비해 APX 활성이 훨씬 높았다. SOD, CAT 및 POX와 유사하게 4엽의 GR 활성은 10 $\mu$ M oxyfluorfen 처리로 인해 무처리에 비해 증가한 반면에 100, 1,000 $\mu$ M 처리에서는 감소하였다. 그러나 4엽의 GR 활성은 10 $\mu$ M oxyfluorfen 처리에서 1엽에 비해 무려 4배 이상의 높은 활성을 보였다.

1엽과 4엽간의 항산화효소 활성은 신토좌의 경우에서도 중앙애호박처럼 유사한 경향을 보였다. 즉 oxyfluorfen이 처리되지 않은 상태의 SOD, CAT, POX, APX 및 GR의 활성은 4엽이 1엽에 비해 높은 활성을 보였다. 특히 SOD, APX 및 GR에서 엽령간

뚜렷한 차이를 보였다. Oxyfluorfen 처리 후 신토좌의 SOD 활성은 중앙애호박과 다르게 처리농도 증가 하더라도 활성증가 경향은 볼 수 없었다. 하지만 oxyfluorfen 처리에 의한 4엽의 SOD 활성은 1엽에 비해 일관성 있게 높은 경향을 보였다. CAT 활성은 oxyfluorfen 처리에 따른 1엽과 4엽간에 차이를 보이지 않았다. 1엽의 POX 활성은 무처리와 oxyfluorfen 처리간에 차이를 보이지 않았으나, 4엽의 경우는 oxyfluorfen 처리농도가 증가할수록 POX 활성은 증가하였다. 4엽의 POX 활성은 1엽에 비해 각각 약 8, 9, 10배 이상의 높은 활성을 보였다. APX 경우도 1엽에서는 oxyfluorfen 처리농도가 증가하더라도 무처리와 유사한 경향을 보였으나, 4엽은 10 및 100 $\mu$ M 처리까지는 무처리에 비해 APX 활성이 증가하였으나 1,000 $\mu$ M에서는 유사한 경향을 보였다. Oxyfluorfen을 처리한 4엽의 GR 활성은 1엽에 비해 2~3배 이상 높았다.

중앙애호박과 신토좌에서 항산화효소 SOD, CAT, POX, APX 및 GR의 증가는 식물에서 중화를 필요로 한 강한 산화제가 존재함을 의미한다. 또한 Protox 저해형 제초제는 감수성 식물에서 높은 활성산소종을 발생하고 이들 활성산소종은 지질과산화 원인이 된다. 그래서 4엽이 oxyfluorfen 처리 후 1엽에 비해 높은 항산화효소 활성을 보였다. 이처럼 4엽에서 항산화효소 활성이 유도 되었을지라도 Protox 저해제의 독성 효과를 극복하기에는 충분하지 않았기 때문이며 결국 식물은 Protox 저해제 처리로 인해 피해를 받거나 죽게 된다. 일부 연구에서는 oxyfluorfen에 내성인 식물이 감수성 식물에 비해 항산화효소 활성이 높다고 하였으나(최 등 1996; Duke 등 1991; Komives와 Gullner 1994), 본 연구에서는 이와 상반되게 감수성인 4엽이 내성인 1엽에 비해 높은 항산화효소 활성을 보여 항산화효소의 무독화 시스템은 호박 엽령간 내성을 결정하는 데는 크게 관여되지 않는 것으로 판단되었다.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때 호박 엽령간에 보이는 oxyfluorfen의 내성차이는 Protox 저해로 인한 Proto IX와 같은 포르피린 생합성 경로 중간물질에 의해 기인되는 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 수



행되지 않았던 제초제의 흡수, 이행 및 대사와 같은 요인도 엽령간에 보인 oxyfluorfen에 대한 내성요인으로 고려할 수 있을 것으로 보인다. 한편 Chun 등 (2001)은 oxyfluorfen에 중간 내성 차이를 보인 밀과 보리에서도 epicuticular wax는 유의적인 차이가 없다고 하였고 cuticle량에서만 상대적으로 내성인 밀이 보리보다 많았다고 하였다. Acifluorfen에 내성과 감수성 토마토 품종간에 epicuticular wax와 cuticle량을 조사한 결과도 이들 품종들간 내성차이는 epicuticular wax와 cuticle량과 관련이 없다고 보고하였다(Ricotta와 Masiunas 1992). 그러나 epicuticular wax와 cuticle의 양적인 차이보다는 질적 차이가 제초제 내성요인이 될 수 있다고 하였다(Pereira 등 1971; Wilkinson 1980). 따라서 oxyfluorfen에 대한 엽령간 내성차이를 보다 정확하게 구명하기 위해서는 추후에 엽령별 제초제 흡수, 이행, 대사 및 잎 표면구조의 특성에 관한 연구가 수행되어야 할 것이다.

## 요 약

Protoporphyrinogen oxidase(Protox) 저해형 제초제인 oxyfluorfen에 대한 내성차이는 동일 개체내의 호박 엽령에서 관찰되었다. 엽위별 oxyfluorfen에 내성기작을 구명하기 위해 잎의 피해정도, 세포내 구성물질의 누출, 포르피린 생합성 경로의 tetrapyrrole 중간물질 축적량 및 항산화효소 활성을 포함한 생리적 반응을 조사하였다. 중앙애호박의 1, 2 및 3엽에 대한 oxyfluorfen에 내성은 4엽에 비해 각각 >10,000, 1,286 및 1.6배 높았고, 신토좌의 1, 2 및 3엽에 대한 oxyfluorfen에 내성은 4엽에 비해 각각 725, 366, >0.6배 높았다. 그러나 oxyfluorfen과 작용기작이 다른 paraquat 처리에서는 oxyfluorfen 처리의 결과와 다르게 두 품종 모두 상위엽인 4엽이 하위엽인 1, 2 및 3엽에 비해 훨씬 피해가 적었다. Oxyfluorfen 처리에 따른 전해물질의 누출은 처리 후 광노출 기간이 경과할수록 상위엽(4엽)에서 하위엽(1, 2, 3엽) 보다 많았다. Oxyfluorfen 처리에 의한 tetrapyrrole 중간물질 protoporphyrin IX(Proto IX), Mg-Proto IX 및 Mg-

Proto IX monomethyl ester의 축적량은 감수성인 4엽이 내성인 1엽에 비해 많았다. 따라서 oxyfluorfen 처리에 대한 호박 엽령별 반응 차이는 tetrapyrrole 중간물질의 과다한 축적에 의해 기인되는 것으로 생각된다. Tetrapyrrole 중간 물질 축적량의 결과와 다르게 항산화효소 superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase 및 glutathione reductase 활성은 무처리 및 oxyfluorfen 처리 후 4엽이 1엽에 비해 높았다. 그러나 4엽에서 항산화효소 활성 유도는 Protox 저해제 oxyfluorfen의 독성효과를 극복하는데 충분하지 않아 결국 4엽은 고사하게 되는 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 연구는 연구재단 연구비 지원에 의해 수행된 연구임(KRF-2008-F00003).

## 인 용 문 헌

- 구자옥, 국용인. 1997. Protoporphyrinogen oxidase 저해형 제초제에 대한 밀(*Triticum aestivum* L.)과 보리(*Hordeum vulgare* L.)의 특이반응 작용기작 I. 흡수 및 해부학적 차이. 한국작물학회지 42:68-78.
- 국용인, 구자옥. 1996. Protoporphyrinogen oxidase 저해형 Oxyfluorfen에 대한 식물종간 내성차이. 한국환경농학회지 15:316-324.
- 국용인, 구자옥, 전재철. 1996. Oxyfluorfen에 대한 내성 및 감수성 벼품종의 생리활성 기구 III. Protoporphyrinogen oxidase(Protox) 활성과 Protoporphyrinogen IX(PPIX) 축적. 한국잡초학회지 16:150-159.
- 국용인, 구자옥. 1997. Protoporphyrinogen oxidase 저해형 제초제에 대한 밀(*Triticum aestivum* L.)과 보리(*Hordeum vulgare* L.)의 특이반응 작용기작 II. Protoporphyrin IX 축적 및 항산화 방

- 어게 차이. 한국작물학회지 42:79-88.
- 국용인, 신지산, 정정성, 권오도, 김동관, 한옥수, 구자옥. 2003. Protoporphyrinogen oxidase 저해형 제초제와 Paraquat에 대한 담배 엽령별 내성차이와 기작. 한국잡초학회지 23:100-111.
- 손민. 2007. 밀과 보리의 엽위별 oxyfluorfen에 대한 내성 차이. 전북대학교 석사학위논문 p. 45.
- 이희재, 신지산, 한성욱, 구자옥. 1998. Oxyfluorfen에 대한 담배의 엽령별 생리적 반응. 한국잡초학회지 18:69-75.
- 최성환, 김노열, 이증주. 1996. Diphenyl ether계 제초제 Oxyfluorfen에 대한 벼 품종간 저항성기구. 한국잡초학회지 16:362-371.
- Becerril, J. M., and S. O. Duke. 1989. Protoporphyrin IX content correlates with activity of photobleaching herbicides. Plant Physiol. 90:1175-1181.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Chen, G. X., and K. Asada. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves : Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiol. 30:987-998.
- Choi, J. S., H. J. Lee, I. T. Hwang, J. Y. Pyon and K. Y. Cho. 1999. Differential susceptibilities of wheat and barley to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. Pestic. Biochem. Physiol. 65:62-72.
- Chun, J. C., H. J. Lee, S. J. Lim, S. E. Kim and J. O. Guh. 2001. Comparative absorption, translocation, and metabolism of foliar-applied oxyfluorfen in wheat and barley. Pestic. Biochem. Physiol. 70:118-125.
- Donahue, J. L., C. M. Okpodu, C. L. Cramer, E. A. Grabau and R. G. Alscher. 1997. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves : Relationships to resistance. Plant Physiol. 113:249-257.
- Duke, S. O., J. Lydon, J. M. Becerril, T. D. Sherman, L. P. Lehnen and H. Matsumoto. 1991. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. Weed Sci. 39:465-473.
- Eastin, E. F. 1971. Fate of fluorodifen in resistant peanut seedlings. Weed Sci. 19:262-265.
- Egley, G. H, R. N., Paul Jr, K. C. Vaughn and S. O. Duke. 1983. Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in *Sida spinosa* L. Plants. 157:224-232.
- Finckh, B. F., and K. J. Kunert. 1985. Vitamins C and E : An antioxidative system against herbicide-induced lipid peroxidation in higher plants. J. Agric. Food Chem. 33:574-577.
- Frear, D. S., H. R. Swanson and E. R. Mansager. 1983. Acifluorfen metabolism in soybean : Diphenylether bond cleavage and the formation of homogluthathione, cysteine, and glucose conjugates. Pestic. Biochem. Physiol. 20:299-310.
- Guh, J. O., K. Ishizuka and J. Y. Pyon. 1988. Differential absorption and translocation of oxyfluorfen between selected rice cultivars. Korean J. Weed Sci. 8:37-44.
- Haworth, P., and F. D. Hess. 1988. The generation of singlet oxygen ( $^1O_2$ ) by the nitrodiphenyl ether herbicide oxyfluorfen is independent of photosynthesis. Plant Physiol. 86:672-676.
- Jacobs, J. M., and N. J. Jacobs. 1993. Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) plastids : Effect of diphenyl ether herbicides. Plant Physiol. 101:1181-1187.
- Jacobs, J. M., N. J. Jacobs and S. O. Duke. 1996. Protoporphyrinogen destruction by plant extracts and correlation with tolerance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. Pestic. Biochem. Physiol. 55:77-83.
- Komives, T., and G. Gullner. 1994. Mechanism of plant tolerance to photodynamic herbicides. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 559:177-190.

- Kuk, Y. I., J. S. Shin, H. I. Jung, J. O. Guh, S. Jung and N. R. Burgos. 2006. Mechanism of paraquat tolerance in cucumber leaves of various ages. *Weed Sci.* 54:6-15.
- Lee, H. J., and S. O. Duke. 1994. Protoporphyrinogen IX-oxidizing activities involved in the mode of action of peroxidizing herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 42:2610-2618.
- Lee, J. J., H. Matsumoto and K. Ishizuka. 1992. Light involvement in oxyfluorfen-induced protoporphyrin IX accumulation in several species of intact plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 44:119-125.
- Lermontova, I., and B. Grimm. 2000. Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen. *Plant Physiol.* 122:75-83.
- Matringe, M., J. M. Camadro, P. Labbe and R. Scalla. 1989. Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target of diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 260:231-235.
- Matsumoto, H., S. Kojima and K. Ishizuka. 1990. Characteristics of herbicidal injury by diphenyl-ether herbicides oxyfluorfen and bifenox in *Lemna pausicostata* Hegelm. 6746. *J. Agric. Food Chem.* 38:2066-2071.
- Mishra, N. P., R. K. Mishra and G. S. Singhal. 1993. Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves of strong visible light at different temperature in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol.* 102:903-910.
- Pereira, J. F., W. F. Splittstoesser and H. J. Hopfen. 1971. Mechanism of intra-specific selectivity of cabbage to nitrofen. *Weed Sci.* 19:647-655.
- Rao, M. V., G. Paliyath and D. P. Ormrod. 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110:125-136.
- Ricotta, J. A., and J. B. Masiunas. 1992. Relationship of leaf surface characteristics to acifluorfen tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and related species. *Weed Sci.* 40:402-407.
- Scalla, R., and M. Matringe. 1994. Inhibitors of protoporphyrinogen oxidase as herbicides : Diphenyl ethers and related photobleaching molecules. *Rev. Weed Sci.* 6:103-132.
- Sherman, T. D., J. M. Becerril, H. Matsumoto, M. V. Duke, J. M. Jacobs, N. J. Jacobs and S. O. Duke. 1991. Physiological basis for differential sensitivities of plant species to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* 97: 280-287.
- Spychalla, J. P., and S. L. Desborough. 1990. Superoxide dismutase, catalase, and  $\alpha$ -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiol.* 94:1214-1218.
- Wilkinson, R. E. 1980. Ecotype variation of tamarix pentandra epicuticular wax and possible relationship with herbicide sensitivity. *Weed Sci.* 28:110-113.
- Witkowski, D. A., and B. P. Halling. 1989. Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorfen-methyl. *Plant Physiol.* 90:1239-1242.