Protoporphyrinogen Oxidase (Protox) 유전자 과다발현 제초제 저항성 형질전환 벼의 생육저해 기작

국용인[1*], 신지산[1], 윤영범[1], 권오도[2]

Mechanism of Growth Inhibition in Herbicide-Resistant Transgenic Rice Overexpressing Protoporphyrinogen Oxidase (Protox) Gene

Yong In Kuk[1*], Ji San Shin[1], Young Beom Yun[1] and Oh-Do Kwon[2]

ABSTRACT We investigated the levels of resistance and accumulation of terapyrroles, reactive oxygen species, lipid peroxidation, and antioxidative enzymes for reasons of growth reduction in herbicide-transgenic rice overexpressing *Myxococcus xanthus, Arabidopsis thaliana,* and human protoporphyrinogen oxidase (Protox) genes. The transgenic rice overexpressing *M. xanthus* (MX, MX1, PX), *A. thaliana* (AP31, AP36, AP37), and human (H45, H48, H49) Protox genes showed 43~65, 41~72 and 17~70-fold more resistance to oxyfluorfen, respectively, than the wild type. Among transgenic rice lines overexpressing Protox genes, several lines showed normal growth compared with the wild type, but several lines showed in reduction of plant height and shoot fresh weight under different light conditions. However, reduction of plant height of AP37 was much higher than other lines for the experimental period. On the other hand, the reduction of plant height and shoot fresh weight in the transgenic rice was higher in high light condition than in low light condition. Enhanced levels of Proto Ⅸ were observed in transgenic lines AP31, AP37, and H48 at 7 days after seeding (DAS) and transgenic lines PX, AP37, and H48 at 14 DAS relative to wild type. There were no differences in Mg-Proto Ⅸ of transgenic lines except for H41 and H48 and Mg-Proto Ⅸ monomethyl ester of transgenic lines except for MX, MX1, and PX. Although accumulation of tetrapyrrole intermediates was observed in transgenic lines, their tetrapyrrole accumulation levels were not enough to inhibit growth of transgenic rice. There were no differences

[1] 순천대학교 생명산업과학대학 자원식물개발학과, 540-742 전남 순천시 중앙로 413(Dept. of Development in Resources, College of Life Science and Natural Resources, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea).
[2] 전남농업기술원 작물연구과, 520-715 전남 나주시 산포면 산제리 206-7(Jeonnam Agricultural Research and Extension Service, Naju 520-715, Korea).
* 연락저자(Corresponding author) : Phone) +82-61-750-3286, Fax) +82-61-750-3280, E-mail) yikuk@sunchon.ac.kr
(Received May 28, 2010; Examined June 16, 2010; Accepted June 23, 2010)

in reactive oxygen species, MDA, ALA synthesizing capacity, and chlorophyll between transgenic lines and wild type indicating that accumulated tetrapyrrole intermediate were apparently not high enough to inhibit growth of transgenic rice. Therefore, the growth reduction in certain transgenic lines may not be caused by a single factor such as Proto Ⅸ, but by interaction of many other factors.

Key words: fitness; porhyrin biosynthesis; protox inhibitor; transgenic rice.

서 언

Porphyrin 생합성 경로는 식물의 대사과정에서 매우 중요한 엽록소와 heme을 만드는 과정으로 엽록체와 미토콘드리아에서 이루어진다(Duke 등 1991). 식물에서는 글루탐산으로부터 형성된 5-aminolevulinic acid(ALA)은 ALA 탈수효소의 작용에 의해 porphobilinogen(PBG)으로 되고 이 PBG에 의해 만들어진 tetrapyrrole이 단계적인 산화적 탈카르복실화 과정을 거쳐 protoporphyrinogen Ⅸ(Protogen Ⅸ)으로 된다. Protogen Ⅸ은 protophophyrinogen oxidase(Protox)의 작용에 의해 protoporphyrin Ⅸ (Proto Ⅸ)으로 산화된 후 Mg-Proto Ⅸ chelatase에 의해 마그네슘과 결합하면 엽록소 합성으로 이루어지고 Fe-Proto Ⅸ chelatase에 의해 철과 결합하면 heme 합성으로 이루어진다(Duke 등 1991). Porphyrin 생합성 경로에 관여한 효소 중의 하나인 Protox를 저해하는 제초제는 diphenyl ether계를 비롯한 9개 계통에 27종의 제초제가 있으며 이들 제초제는 식물체에 급격한 탈수와 탈색을 일으키는 접촉형제초제이다(Duke 등 1991). 이들 제초제의 작용점인 Protox는 porphyrin 생합성 과정에서 Protogen Ⅸ이 Proto Ⅸ으로 산화되는 과정을 촉매하는 효소이다(Duke와 Rebeiz 1994). Protox 활성 저해는 결과적으로 Protogen Ⅸ을 축적케 하고 이 Protogen Ⅸ은 엽록체에서 세포질로 이동하여 빠르게 Proto Ⅸ으로 산화된다(Lee 등 1993). Proto Ⅸ은 친유성을 가지고 있기 때문에 다시 엽록체로 이동할 수 없어 결국 원형질막에 축적된다. Proto Ⅸ이 엽록체와 미토콘드리아에 위치한 Mg 및 Fe-chelatase와 상호작용을 할 수 없기 때문에 엽록소와 heme 합성에 Proto Ⅸ을 이용할 수 없게 된다(Matringe 등 1989). 세포질에 Proto Ⅸ은 광과 분자산소 존재 하에서 활성이 높은 단일항산소를 발생시켜 세포막의 지질과산화를 유도하고, 궁극적으로 세포를 죽게 한다(Jacobs 등 1991).

그러나 지금까지 개발된 많은 Protox 저해 제초제는 선택성 폭이 매우 좁다. 그래서 이들 제초제들은 과수원에 과수가 직접 접촉되지 않도록 국부처리로 제한하고 있으며 이들 제초제에 상대적으로 내성을 보인 양파, 완두, 목화 등을 제외하고는 식물종간에 선택성이 적어 작물 생육기에 제초목적으로 사용하기에는 어려운 점이 있다(Scalla와 Matringe 1994).

이들 제초제의 선택성 결여 문제를 해결하기 위하여 제초제 내성 유전자를 작물에 도입하여 제초제 저항성 작물을 개발하고 있다. 최근에 *Bacillus subtilis* (Ha 등 2003; Lee 등 2000), *Arabidopsis thaliana*(Ha 등 2004), *Homo sapiens*(Lee 등 2004) 및 *Myxococcus xanthus*(Jung 등 2004) Protox 유전자를 벼에 도입하여 Protox 저해 제초제에 저항성 형질전환 벼가 개발되었다. 이중 *B. subtilis*(Ha 등 2003)와 *A. thaliana* (Ha 등 2004) Protox 유전자를 발현시킨 형질전환 벼는 비형질전환 벼에 비해 Protox 저해 제초제에 대해 각각 2배 및 10배 저항성을 보였고, *H. sapiens*(Lee 등 2004) Protox 유전자를 발현시킨 형질전환 벼는 20μM의 oxyfluorfen를 종자에 처리하였을 때 발아되었으나 비형질전환벼는 그 농도에서 발아되지 않았다. 독일의 Dr. Grimm 그룹이 개발한 *A. thaliana* Protox 발현 형질전환 담배의 경우, 300nM의 acifluorfen에서 발아저항성을 보였다(Lermontova와 Grimm 2000). 그렇지만, *M. xanthus*(Jung 등 2008) Protox 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 벼는 무려 10,000g ha^{-1}의 oxyfluorfen 처리에도 거의 피해를 보이지 않는 높은

저항성을 보였다.

위의 Protox 유전자 중 *B. subtilis* Protox 유전자는 Protox 저해 제초제에 저항성인 것으로 알려졌으나 이 유전자가 도입된 형질전환 벼는 제초제에 대한 저항성이 크게 증대되지 않았다(Ha 등 2003; Lee 등 2000). 그러나 *A. thaliana*, *H. sapiens* 및 *M. xanthus* Protox 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 벼는 Protox 저해제에 저항성을 보였다(Ha 등 2004; Lee 등 2004; Jung 등 2004, 2007). 하지만 이러한 형질전환 벼는 발현된 Protox 유전자 종류, 세포내 유전자 표적위치 및 형질전환 라인에 따라 저항성 차이가 있었으며, 어떤 Protox 유전자가 도입된 형질전환 벼는 유묘기 때부터 생육기 전반에 걸쳐 생육저해로 인해 수확기에는 상당한 수량감소가 야기되었다. 특히 이러한 현상은 *H. sapiens* Protox 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 벼에서 뚜렷하게 나타난 경향이었다(Jung 등 2008). 그러나 어떤 형질전환작물들은 생육저해 현상이 야기되지 않으면서 원하는 형질이 발현된 반면에 어떤 형질전환 작물은 원하는 형질은 발현되나 다소 생육저해 및 수량감소가 야기되나 그 구체적인 기작에 관한 연구는 적은 편이다.

따라서 본 연구의 목적은 다양한 생물종의 Protox 유전자 과다발현 제초제 저항성 형질전환 벼의 생육저해 원인이 생육시기별 tetrapyrrole 중간물질 축적과 대사 경로 물질, 활성산소 발생, 지질과산화작용 및 항산화 효소 능력 등과의 관련성이 있는지를 조사하는데 있다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 *A. thaliana*(Ha 등 2003) *H. sapiens* (Lee 등 2004) 및 *M. xanthus* (Jung 등 2004) Protox 유전자 과다발현 제초제 저항성 형질전환 벼를 사용하였다. 이들 형질전환 벼의 특성은 표 1과 같다. 형질이 완전 고정된 형질전환 벼 종자를 2007년 수도포장에 다시 파종하고 수확한 종자를 본 시험에 사용하였다. *A. thaliana* Protox 유전자 과다발현 형질전환 벼 T3 세대 3라인(AP31, AP36, AP37), *H. sapiens* Protox 유전자 과다발현 벼 T3 세대 4라인(H41, H45, H48, H49)과 *M. xanthus* Protox 유전자가 과다발현 형질전환 벼 T8세대 2라인(MX, MX1)과 항생제 저항성 유전자가 없는 *M. xanthus* 유전자가 과다 발현한 형질전환 벼 T3세대 1라인(PX)을 사용하였다.

Protox 유전자 종류별 형질전환 벼의 제초제 저항성 수준

위의 형질전환 벼 종자를 파종하여 3엽기가 되었을 때 Protox 저해제 중 대표적인 dipehyl ether계인 oxyfluorfen(0, 10, 100, 300, 500, 1,000, 3,000μM)를 처리하였다. 처리 후 5일째에 벼의 약해정도를 달관평가(0~100, 100; 완전고사)와 지상부 생체중을 조사하여 알아보았다. 이들 자료 중 지상부 생체중에 의해 회귀식을 구하고 그 회귀식에 근거하여 I_{50}를 산출하여 비형질전환벼(동진벼)와 Protox 유전자별 형질전환벼의 저항성 정도를 알아보았다. 본 연구에 사용된 직선회귀 방정식은 다음과 같다.

$$y=y_0+ax+bx^2$$

다른 광조건하에서 Protox 유전자별 저항성 형질전환 벼의 생육 및 Biomass 차이

Protox 유전자별 저항성 형질전환 벼와 비형질전환 벼를 25℃에서 4일간 침종하고 최아 시킨 후 균일하게 최아한 종자를 선별하여 수도용 상토로 충진된 소형포트(150ml)에 각각 5립의 종자를 파종하고, 주야간의 평균온도 30/25℃, 상대습도 65/80%의 생장상의 암조건과 동일 생장상에 저광(50μmol m^{-2} s^{-1} PPF)과 고광(200μmol m^{-2} s^{-1} PPF)인 조건하에서 파종 후 7, 9, 13, 15일에 초장을 조사하였고, 파종 후 15일째는 지상부 생체중을 조사하였다.

Protox 유전자별 저항성 형질전환 벼의 Tetrapyrrole 중간물질 축적

위의 광조건 실험에서 생육저해는 고광조건에서 뚜렷하였다. 따라서 고광조건하에서 형질전환벼를 파종하고 파종 후 7일과 14일째에 porphyrin 생합성 경로에 관련된 물질을 조사하였다.

ALA 합성 능력

위의 Protox 유전자별 저항성 형질전환 벼 엽 절편(100mg)을 4mm 크기로 만들어 40mM levulinic acid를 함유한 20mM phosphate buffer(pH 6.9) 5ml가 들어있는 Petri dish에 절편을 치상한 후 25℃의 생장상에 6시간 광 상태(200μmol m^{-2} s^{-1} PPF)에서 배양하였다. 이렇게 배양한 식물체를 20mM phosphate buffer(pH 6.9) 1ml에 넣어 마쇄하고, 10,000g의 속도로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻은 상징액 0.5ml에 ethyl acetoacetate를 0.1ml 넣어 95℃의 water bath에서 10분간 배양하였다. 배양된 액을 10분간 얼음위에서 식힌 후 Ehrlichs 시약(Lermontova와 Grimm 2000)을 0.6ml 넣어 교반한 후 분광광도계를 이용하여 553nm에서 흡광도를 측정하였다. ALA 정량은 표준 ALA 농도에 의해 얻어진 직선회귀에 의해 계산하였다.

Porphyrin 중간물질 추적

Protox 유전자별 저항성 형질전환벼 엽 절편(100mg)을 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 상징액을 취하고 나일론 필터(0.2μm pore size)로 거른 후 사용하기 전까지 -70℃의 냉동고에 보관하였다. Porphyrin은 NovaPak C_{18} column(4-μm particle size, 4.6 × 250 mm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용한 HPLC로 분석하였다. HPLC는 형광검출기로 methanol과 0.1M ammonium phosphate (pH 5.8)의 이동상(1ml $min.^{-1}$)을 이용하여 Proto Ⅸ는 여기 및 형광 파장을 각각 400과 630nm에서 그리고 Mg-Proto Ⅸ와 Mg-ProtoMe Ⅸ는 415와 595nm에서 측정하였다. 이들 물질들은 표준물질과 비교하여 정량화하였다(Lermontova와 Grimm 2000).

Protox 유전자별 과다발현 저항성 형질전환 벼의 생화학적 반응

활성산소 발생

각 형질전환 벼에서 생성된 $O_2^{\cdot-}$는 Wang와 Luo (1990) 방법에 준하여 hydroxylamine 산화정도로 측정하였다. H_2O_2 함량은 각 형질전환벼 엽 절편(200mg)을 막자사발에 넣고 3ml의 50mM phosphate buffer(pH 6.8)에 마쇄한 다음, 4℃의 온도에서 6,000g의 속도로 25분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상징액에 0.1% titanium chloride와 20% H_2SO_4의 용액 1ml을 넣고 희석한 후 다시 4℃의 온도에서 6,000g의 속도로 15분간 원심분리를 하였다. 반응이 이루어진 상징액은 분광광도계를 이용하여 410nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다(Jana와 Choudhuri 1981).

세포막 지질과산화작용

지질과산화작용은 thiobarbituric acid(TBA)방법을 이용하여 malondialdehyde(MDA) 생성량을 측정하여 조사하였다. 각 생육시기의 형질전환 벼의 조직체를 수확한 후 MDA 생성량을 측정할 때까지 -70℃의 냉동고에 보관하였다. 냉동고에서 꺼낸 잎은 막자사발에 넣고 20% TCA에 0.5% TBA가 용해되어 있는 용액을 5ml 넣어 마쇄한 다음, 20,000g의 속도로 15분간 원심분리하여 상징액을 취하였다. 이 상징액을 100℃에서 25분간 끓인 다음 ice bath에 넣어 냉각시킨 후 다시 20,000g의 속도로 15분간 원심분리하여 얻은 상징액을 분광광도계를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하고 600nm에서의 흡광도 값으로 보정하였다. MDA 농도는 156$mM^{-1}cm^{-1}$의 molar extinction coefficient를 이용하여 산출하였다. 산출된 배양액과 잎을 MDA 농도를 합하여 생체중 당으로 환산하여 총 MDA 농도로 표시하였다(Buege와 Aust 1978).

엽록소 함량 측정

엽 절편(100mg)을 채취하여 시험관에 넣고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 용매로 하여 48시간 동안 암상태에서 엽록소를 추출한 다음 분광광도계로 645와 663nm에서 흡광도를 측정한 후 다음의 식에 의해 엽록소 함량을 계산하였다(Hiscox와 Israelstam, 1979).

$$\text{Chlorophyll(mg/L)} = (20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}) \times \text{dilution factor.}$$

Protox 유전자별 과다발현 형질전환 벼의 항산화효소 활성

형질전환 벼와 비형질전환 벼 잎을 각각 0.5g 수확하여 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 상징액을 항산화효소 분석에 사용하였다. Ascorbate peroxidase (APX) 경우 위의 추출 buffer에 10mM ascorbate를 첨가하였고, superoxide dismutase(SOD) 활성은 조효소액을 PD-10 column에 여과시킨 후 사용하였다. SOD의 활성은 0.1mM EDTA, 0.015mM ferricytochrome C, 0.05mM xanthine이 첨가된 50mM $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 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(Spychalla와 Desborough 1990). SOD 활성의 단위는 cytochrome C의 환원이 50% 저해되는 데 필요한 조효소의 양을 기준으로 하여 계산하였다. Catalase(CAT) 활성은 Mishra 등(1993)의 방법에 의해 측정하였고, 반응액은 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)와 11mM H_2O_2로 하였다. CAT 활성은 효소 추출액을 넣고 240nm에 1분간 흡광도 변화로 측정하였다. Peroxidase(POX) 활성은 효소 추출액을 넣고 470nm에서 guaiacol 발생량으로 측정하였다(Egley 등 1983). APX의 활성은 ascorbate의 산화 정도를 290nm에서의 흡광도 감소로 측정하였고(Chen과 Asada 1989), APX의 반응액은 0.5mM ascorbate와 0.2mM H_2O_2가 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 감소로 조사하였다. 단백질 함량의 측정은 Bradford(1976)의 방법에 준하여 실시하였다.

통계처리

본 실험은 완전임의 배치 3반복으로 하였으며, 통계처리는 최소유의차 검정(P=0.05)을 실시하여 유의성 유무를 확인하였다(SAS 2000).

결과 및 고찰

Protox 유전자별 형질전환 벼의 제초제 저항성 수준

본 연구에 사용된 *A. thaliana*(Ha 등 2003), *H. sapiens*(Lee 등 2004) 및 *M. xanthus*(Jung 등 2004) Protox 유전자를 과다발현 시킨 제초제 저항성 형질전환 벼에 대한 분자적 특성 및 저항성기작에 관한 각각의 연구는 이미 보고된바 있다. 그러나 이들 형질전환벼는 세포내 표적위치 및 Protox 유전자 종류가 다르지만(표 1), Protox 유전자별로 제초제 저항성 수준을 비교한 바는 없다. 따라서 Protox 유전자별로 과다발현한 형질전환 벼의 저항성정도를 알아보기 위하여 이들 종자를 3엽기까지 생육하여 Protox 저해제 중의 하나인 oxyfluorfen을 처리하였다(표 2). I_{50}에 기초하여 이들 형질전환벼간에 저항성 수준을 확인한 결과 항생제 marker가 있는 *M. xanthus* Protox 유

Table 1. Transgenic rice used in this study.

Protox gene	Cellular location	Targeted site	Protox activity (T/W ratios[a])	Level of resistance	Reference
A. thaliana	Soluble protein	Chloroplast	3-4 fold	Low	Ha et. al. 2004
H. sapiens	Membrane protein	Mitochondria	6-9 fold	Low	Lee et. al. 2004
M. xanthus	Membrane protein	Chloroplast and mitochondria	7-8 fold	High	Jung et. al. 2004

[a]T, trangenic line; W, wild type.

Table 2. Whole-plant bioassays of *M. xanthus*, Arabidopsis, and human Protox transgenic lines to oxyfluorfen.

Line[a]	Regression equation[b]	R^2	I_{50} (μM)[c]	Line/WT ratio[d]
WT	$y = -0.0001x^2 + 0.1493x + 43.24$	0.79	46.7	1.0
TC	$y = -0.00009x^2 + 0.128x + 56.398$	0.70	48.3	1.0
MX	$y = -0.000002x^2 + 0.0271x + 4.1096$	0.78	1983.8	42.5
PX	$y = 0.0000001x^2 + 0.0187x - 7.6864$	0.97	3035.6	65.0
AP31	$y = -0.000001x^2 + 0.0267x - 1.6801$	0.99	1952.5	41.8
AP36	$y = 0.000003x^2 + 0.0059x - 0.8415$	0.99	3249.2	69.6
AP37	$y = 0.000002x^2 + 0.0098x - 4.6041$	0.99	3321.0	71.7
H45	$y = -0.00004x^2 + 0.1158x - 16.616$	0.86	791.9	17.0
H48	$y = 0.00008x^2 - 0.0483x + 4.8331$	0.99	1111.6	23.8
H49	$y = 0.000003x^2 + 0.0074x - 1.7836$	0.98	3249.2	69.6

[a]WT, wild type; TC, transgenic control; MX, *M. xanthus* Protox transgenic lines; PX, *M. xanthus* Protox transgenic lines with marker free; AP31-37, Arabidopsis Protox transgenic lines; H41-49, human Protox transgenic lines.
[b]Regression equation generated using the herbicide concentration in μM.
[c]I_{50} values were the herbicide concentrations that reduced shoot fresh weight by 50%.
[d]Line/WT ratios were calculated relative to the I_{50} values of the wild-type transgenic rice plants.

전자(MX)와 항생제 marker가 없는 *M. xanthus* Protox 유전자(PX) 과다 발현한 형질전환 벼는 비형질전환벼에 비해 oxyfluorfen에 43~65배 저항성을 보였고, *A. thaliana* Protox 유전자 과다발현 형질전환벼(AP31, AP36, AP37)는 41~72배 그리고 인간 Protox 유전자 과다발현 형질전환벼(H45, H48, H49)는 17~70배 저항성을 보였다. 이들 결과로 볼 때 Protox 유전자별 과다발현 형질전환벼들은 whole plant 수준에서 서로 다른 저항성 정도를 보였으나, 이러한 차이는 Protox 유전자 종류에 의한 차이보다는 이들 유전자의 표적위치 때문으로 생각된다. 왜냐하면 *A. thaliana* Protox 유전자 형질전환벼는 엽록체에 표적되었고, *H. sapiens* Protox 유전자 형질전환벼는 미토콘드리아에 표적되었다. 그러나 *M. xanthus* Protox 유전자 과다 발현한 형질전환 벼는 엽록체와 미토콘드리아에 동시 표적되어 있기 때문이다(표 1). Protox는 세포내 엽록체와 미토콘드리아에 위치하기 때문에 이상적이고 고도의 Protox 저해형 제초제에 저항성 형질전환벼를 개발하기 위해서는 Protox 유전자를 동시 표적하는 것이 바람직하다고 생각된다. 이들 형질전환벼에 대한 저항성 수준을 포장조건에서도 저항성을 보이는지를 추후에 검토해야 할 것이다.

다른 광조건하에서 Protox 유전자별 저항성 형질전환벼의 생육 및 Biomass 차이

Protox 유전자별 제초제 저항성 형질전환벼의 종자를 파종 후 저광(50μmol m^{-2} s^{-1} PPF)과 고광(200μmol m^{-2} s^{-1} PPF) 그리고 암상태 조건하에서 7, 9, 11, 13 및 15일 생육시킨 후 벼의 초장을 조사하였다(표 3). 저광 조건하에서 marker가 없는 *M. xanthus* Protox (PX), *A. thaliana* Protox(AP37) 및 인간 Protox(H41)가 과다 발현된 형질전환 벼의 초장은 파종 후 7일째에 비형질전환벼에 비해 적었다. PX의 초장은 파종 후 9, 11, 13 및 15일에는 차이가 없었으나, H41은 파종 후 9일과 13일에도 비형질전환 벼에 비해 초장이 적었다. 그러나 AP37은 파종 후 전 조사기간에서 비형질전환 비해 초장감소 현상이 뚜렷하였다. 고광조건는 저광조건에 비해 형질전환 벼의 초장 감소가 뚜렷하였고, 특히 파종 후 7일째에는 MX, MX1, PX, AP37 및 H41에서 비형질전환벼에 비해 유의적인 초장 감소를 보였다. 그러나 AP37은 저광조건처럼 고광조건하에서도 파종 후 전 조사기간에 비형질전환벼에 비해 초장의 감소를 보였다. 암조건하에서는 파종 후 7일, 11일 및 15일째에 MX, MX1, PX, AP37 및 H41에서 비형질전환 벼에 비해 유의적인 초장 감소가 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 고광, 저광 및 암조건하에

Table 3. Comparative analysis of plant height among *M. xanthus*, Arabidopsis, and human Protox transgenic lines under various light conditions.

Light[a]	Line[b]	Plant height (cm)				
		7 DAS[c]	9 DAS	11 DAS	13 DAS	15 DAS
LL	WT	16.0[a]	19.0[a]	19.5[a]	21.7[a]	21.8[ab]
	TC	15.8[a]	18.4[a]	19.6[a]	21.8[a]	22.4[a]
	MX	14.8[ab]	16.9[ab]	17.2[ab]	17.3[bc]	17.6[bc]
	MX1	14.3[ab]	16.9[ab]	17.2[ab]	19.4[abc]	19.8[abc]
	PX	13.4[b]	16.9[ab]	17.3[ab]	19.6[ab]	21.2[ab]
	AP37	10.3[c]	14.7[b]	15.4[b]	15.9[c]	16.4[c]
	H41	10.9[c]	16.1[b]	17.2[ab]	17.8[bc]	18.3[abc]
HL	WT	16.9[a]	19.0[a]	23.5[a]	27.3[a]	34.9[a]
	TC	16.4[ab]	18.3[a]	21.4[ab]	26.2[a]	33.8[ab]
	MX	15.2[b]	17.6[a]	18.2[b]	22.2[bc]	28.3[abc]
	MX1	14.6[b]	17.2[a]	18.3[b]	21.8[bc]	29.6[abc]
	PX	15.0[b]	17.7[a]	20.7[ab]	24.8[ab]	27.3[bc]
	AP37	10.8[d]	14.7[b]	17.5[b]	20.3[c]	26.0[c]
	H41	12.6[c]	14.4[b]	20.3[ab]	24.0[ab]	28.3[abc]
Dark	WT	19.3[a]	23.7[a]	24.6[a]	24.6[a]	24.7[a]
	TC	18.9[a]	23.2[a]	20.7[b]	22.9[ab]	23.6[ab]
	MX	14.6[b]	17.8[bc]	18.5[bc]	18.2[cd]	18.4[cd]
	MX1	15.5[b]	20.1[ab]	20.9[b]	20.7[bc]	20.4[cd]
	PX	16.1[b]	20.8[ab]	20.6[bc]	21.5[abc]	21.3[bc]
	AP37	11.6[c]	15.6[c]	17.1[c]	16.9[d]	17.4[d]
	H41	15.3[b]	20.0[ab]	21.0[b]	21.3[abc]	21.3[bc]

[a]LL, low light (50 μmol m^{-2} s^{-1}); HL, high light (200 μmol m^{-2} s^{-1}).
[b]WT, wild type; TC, transgenic control; MX-MX1, *M. xanthus* Protox transgenic lines; PX, *M. xanthus* Protox transgenic lines with marker free; AP37, Arabidopsis Protox transgenic line; H41, human Protox transgenic line.
[c]DAS, days after seeding.
[d]Means within columns followed by the same letter were not significantly different at P=0.05.

서 일관성있게 전 조사시기에 초장의 감소가 야기 되었던 형질전환 라인은 AP37이었다. Protox 유전자별 제초제 저항성 형질전환벼의 생체중은 초장에서 보였던 형질전환간 차이보다 적었으나(표 4), 고광조건의 H41, 저광조건의 MX, AP37, H41 및 암조건의 MX와 H41에서 비형질전환벼에 비해 유의적인 생체중 감소를 보였다.

제초제 저항성 형질전환 작물 중에서 일부는 제초제에 대해 저항성을 보이면서 정상적인 생육과 표현형을 보이지만(Lemontova와 Grim 2000), 일부 형질전환작물들은 유묘기 때까지만 생육저해 현상이 유발되어 후기에 회복되는 경우가 있고, 어떤 형질전환작물의 경우 유묘기 때부터 생육전반에 걸쳐 생육저해 현상이 수확기까지 지속되어 상당한 수량감소가 야기되었다(Lee 등 2004; Jung 등 2008). 본 연구에서는 형질전환벼의 생장량 조사를 유묘기에 했기 때문에 형질전환벼의 생장 차이가 생식생장기까지 지속되는지를 추후에 검토해야 할 것이다.

Protox 유전자별 저항성 형질전환 벼의 Tetrapyrrole 중간물질 축적

Protox 유전자 과다 발현 형질전환벼가 제초제에는 높은 저항성을 띄지만 어떻게 생육 및 생장량 저해 현상이 일어나는지 그 기작을 구명하고자 porphyrin 생

Table 4. Comparative analysis of shoot fresh weight among *M. xanthus*, Arabidopsis, and human Protox transgenic lines under various light conditions.

Line[a]	Shoot fresh wt. (mg/plant)[b]		
	HL[c]	LL	Dark
WT	225.7[a]	101.4[ab]	45.1[a]
TC	217.2[ab]	108.7[a]	47.3[a]
MX	185.9[ab]	81.4[cd]	18.6[b]
MX1	188.8[ab]	96.0[abc]	35.1[ab]
PX	207.9[ab]	86.3[bcd]	32.5[ab]
AP37	194.8[ab]	84.2[cd]	36.8[ab]
H41	174.0[b]	77.7[d]	43.8[a]

[a]WT, wild type; TC, transgenic control; MX-MX1, *M xanthus* Protox transgenic lines; PX, *M xanthus* Protox transgenic lines with marker free; AP37, Arabidopsis Protox transgenic line; H41, human Protox transgenic line.
[b]Shoot fresh weight was measured at 15 days after seeding.
[c]LL, low light (50 μmol m^{-2} s^{-1}); HL, high light (200 μmol m^{-2} s^{-1}).
[d]Means within columns followed by the same letter were not significantly different at *P*=0.05.

합성 경로의 tetrapyrrole 중간물질을 측정하였다. 파종 후 7일과 14일째 형질전환벼의 tetrapyrrole 중간물질 축적량은 표 5와 같다. 즉, 파종 후 7일째 Proto Ⅸ 축적은 AP31, AP37 및 H48에서 비형질전환벼에 비해 유의적으로 많았고, 파종 후 14일째에는 PX, AP37 및 H48에서 유의적으로 많았다. 파종 후 7일째 Mg-Proto Ⅸ은 H41과 H48에서 비형질전환벼에 비해 축적량이 많았을 뿐 파종 후 14일째 축적량은 파종 후 7일에 비해 전 라인에서 큰 폭으로 감소하였고 형질전환 라인간에도 차이가 없었다. Mg-Proto Ⅸ ME는 파종 후 7일째에는 MX, MX1, PX에서 파종 후 14일째에는 TC와 H41에서 유의적으로 축적량이 많았을 뿐 그 밖의 형질전환 라인 간에는 차이가 없었다. 제초제를 처리하지 않는 조건에서 *A. thaliana*, *H. sapiens* 및 *M. xanthus* Protox 유전자를 과다발현 형질전환벼에서 Proto Ⅸ은 비형질전환벼에 비해 2~3배 높은 것으로 보고 된 바 있다(Ha 등 2003; Jung 등 2004, 2008; Lee 등 2004). 또한 인간 Protox 유전자 과다발현 형질전환벼를 12주 생육한 벼에 괴사 반점이 발생하였고 그 잎에서 Proto Ⅸ이 비형질전환벼에 비해 14~24배 더 많이 축적된다고 하였다(Jung 등 2008). 본 연구결과는 이들 연구와 형질전환 작물의 세대 및 조사시기가 다소 상이한 점이 있으나 일부 형질전환 라인에서 tetrapyrrole 중간물질이 유의

Table 5. Comparative analysis of tetrapyrroles in leaves of *M. xanthus*, Arabidopsis, and human Protox transgenic lines.

Line[a]	Proto Ⅸ (nmol/g FW)		Mg-Proto Ⅸ (nmol/g FW)		Mg-Proto Ⅸ ME (nmol/g FW)	
	7 DAS[b]	14 DAS	7 DAS	14 DAS	7 DAS	14 DAS
WT	1.08[b]	2.12[d]	0.43[bc]	0.05[a]	2.23[cd]	0.78[c]
TC	2.19[ab]	2.90[bcd]	0.39[c]	0.07[a]	1.87[d]	2.79[b]
MX	1.92[ab]	2.32[cd]	0.37[c]	0.02[a]	4.03[a]	0.99[c]
MX1	2.64[ab]	2.62[bcd]	0.45[bc]	0.01[a]	3.93[ab]	1.14[bc]
PX	2.88[ab]	3.19[bc]	0.36[c]	0.03[a]	4.38[a]	1.88[bc]
AP31	3.31[a]	2.64[bcd]	0.36[c]	0.01[a]	2.28[cd]	2.25[bc]
AP37	3.72[a]	3.30[b]	0.70[ab]	0.09[a]	2.88[abcd]	1.40[bc]
H41	2.62[ab]	2.55[cd]	0.76[a]	0.08[a]	3.03[abcd]	4.64[a]
H48	3.62[a]	4.32[a]	0.84[a]	0.04[a]	3.56[abc]	2.22[bc]

[a]WT, wild type; TC, transgenic control; MX-MX1, *M. xanthus* Protox transgenic lines; PX, *M. xanthus* Protox transgenic lines with marker free; AP31-37, Arabidopsis Protox transgenic lines; H41-48, human Protox transgenic lines.
[b]DAS, days after seeding.
[c]Means within columns followed by the same letter were not significantly different at *P*=0.05.

적으로 증가하는 것을 볼 때 형질전환벼의 생육 및 생장 저해현상은 tetrapyrrole 중간물질 축적량과 관련이 있는 것으로 사료된다.

Protox 유전자별 과다발현 저항성 형질전환 벼의 생화학적 반응

광활성 물질인 Proto Ⅸ의 과다축적은 광과 산소에 노출되었을 때 막을 파괴하는 radical을 발생시킨다. 광과 분자산소 존재 하에서 세포질에 Proto Ⅸ은 활성이 높은 활성산소종을 발생시켜 세포막의 지질과산화를 유도하고, 궁극적으로 세포를 죽게 한다(Jacobs 등 1991). 따라서 Protox 유전자별 제초제 저항성 형질전환벼 종자를 파종하여 파종 후 7일과 14일에 활성산소종 H_2O_2와 $O_2^{\cdot-}$ 및 지질과산화작용의 지표인 MDA를 조사하였다(표 6). H_2O_2 발생은 파종 후 7일에 인간 Protox 유전자가 과다발현된 형질전환벼 H48에서만 비형질전환벼에 비해 유의적인 증가가 관찰되었을 뿐 다른 라인에서는 차이가 없었다. 파종 후 14일 경우에도 인간 Protox 유전자가 과다 발현된 형질전환벼 H41과 H48에서는 유의적으로 증가되었다. $O_2^{\cdot-}$은 파종 후 7일에는 형질전환라인 간에 차이가 없었으나, 파종 후 14일에만 MX1, AP37, H41에서 비형질전환벼에 비해 발생량이 유의적으로 증가하였다. MDA은 파종 후 7일과 14일에 H41에서만 유의적으로 증가하였고 다른 라인들간에는 차이가 없었다. 비록 본 연구에서는 일중항산소를 분석하지 않았으나, 일반적으로 활성산소종 H_2O_2와 $O_2^{\cdot-}$ 도 세포막의 주요 구성인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화작용을 일으킨다(Duke 등 1991). 하지만 본 연구결과에서 지질과산화작용의 지표인 MDA는 형질전환 라인간에 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 따라서 활성산소종의 발생량과 형질전환벼의 생육저해와의 관련성은 적은 것으로 사료된다.

Proto Ⅸ 축적으로 인해 활성산소종이 발생하나, 식물체내에는 이러한 활성산소종을 소거할 수 있는 항산화효소 및 항산화제가 존재한다. 따라서 SOD, CAT, POX, APX 및 GR과 같은 항산화효소를 형질전환벼 파종 후 7일과 14일에 분석하였다(표 7). CAT 활성의 경우, H41과 H48은 파종 후 14일째에 비형질전환벼에 비해 유의적으로 감소하였고, POX 활성의 경우는 AP31과 H48에서 파종 후 7일에 비형질전환벼에 비해 증가하였고 파종 후 14일에는 H41에서만 증가하였다. APX 활성의 경우는 파종 후 14일에 H41과 GR 활성의 경우는 파종 후 7일에 AP31에서만 증가하였다. 따

Table 6. Comparative analysis of H_2O_2, $O_2^{\cdot-}$, MDA production in leaves of *M. xanthus*, Arabidopsis, and human Protox transgenic lines.

Line[a]	H_2O_2 (mmol/g FW)		$O_2^{\cdot-}$ (μmol/g FW/min)		MDA (mmol/gFW)	
	7 DAS[b]	14 DAS	7 DAS	14 DAS	7 DAS	14 DAS
WT	3.41[b]	2.93[de]	8.23[ab]	4.37[d]	20.77[bc]	26.13[bc]
TC	3.61[b]	3.96[b]	7.40[ab]	5.37[bcd]	20.58[bc]	25.32[bc]
MX	3.48[b]	2.51[e]	10.88[a]	6.60[abcd]	17.16[d]	22.81[c]
MX1	3.46[b]	2.65[e]	8.03[ab]	8.16[a]	20.42[bc]	29.37[bc]
PX	3.33[bc]	3.27[cd]	7.41[ab]	6.89[abcd]	20.55[bc]	26.39[bc]
AP31	3.15[bc]	2.57[e]	7.94[ab]	5.26[cd]	18.55[cd]	24.06[bc]
AP37	2.82[c]	2.61[e]	5.02[b]	7.16[abc]	18.94[cd]	26.00[bc]
H41	3.68[b]	4.51[a]	6.94[ab]	8.00[ab]	24.55[a]	33.10[a]
H48	4.88[a]	3.63[bc]	5.78[ab]	6.70[abcd]	22.68[ab]	31.84[ab]

[a]WT, wild type; TC, transgenic control; MX-MX1, *M. xanthus* Protox transgenic lines; PX, *M. xanthus* Protox transgenic lines with marker free; AP31-37, Arabidopsis Protox transgenic lines; H41-48, human Protox transgenic lines.
[b]DAS, days after seeding.
[c]Means within columns followed by the same letter were not significantly different at P=0.05.

Table 7. Comparative analysis of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR) activities, expressed on a mg protein basis in leaves of *M. xanthus*, Arabidopsis, and human Protox transgenic lines. Plants were harvested at the indicated days and assayed for enzyme activity. Enzyme activities are expressed as units mg^{-1} protein h^{-1}.

Line[a]	SOD		CAT		POX		APX		GR	
	7 DAS[b]	14 DAS	7 DAS	14 DAS	7 DAS	14 DAS	7 DAS	14 DAS	7 DAS	14 DAS
WT	47.21[ab]	57.58[ab]	118.63[a]	186.92[a]	139.06[cde]	217.04[bc]	54.41[a]	92.81[b]	5.49[b]	5.97[abc]
TC	53.75[a]	42.16[b]	167.90[a]	171.29[a]	143.46[cde]	205.85[bc]	100.95[a]	126.22[ab]	5.64[b]	6.43[ab]
MX	44.35[ab]	50.66[ab]	166.18[a]	186.59[a]	141.81[cde]	219.87[bc]	86.02[a]	86.26[b]	6.26[ab]	7.53[a]
MX1	40.24[b]	53.39[ab]	164.83[a]	168.48[a]	122.29[e]	269.86[ab]	67.16[a]	134.58[ab]	5.66[b]	6.12[abc]
PX	41.00[b]	48.71[ab]	164.57[a]	176.13[a]	125.21[de]	187.10[c]	122.06[a]	84.17[b]	5.54[b]	6.57[ab]
AP31	47.29[ab]	52.07[ab]	147.49[a]	174.96[a]	170.05[ab]	231.09[bc]	74.14[a]	99.01[b]	6.71[a]	6.85[ab]
AP37	48.11[ab]	49.99[ab]	169.10[a]	162.96[ab]	148.37[bcd]	213.30[bc]	86.49[a]	96.18[b]	6.30[ab]	6.53[ab]
H41	50.37[ab]	61.39[a]	152.37[a]	131.88[bc]	159.74[abc]	303.60[a]	118.19[a]	190.68[a]	5.94[ab]	4.82[bc]
H48	42.90[b]	50.38[ab]	152.05[a]	118.06[c]	177.65[a]	264.87[ab]	73.22[a]	104.78[b]	6.15[ab]	5.83[bc]

[a]WT, wild type; TC, transgenic control; MX-MX1, *M. xanthus* Protox transgenic lines; PX, *M. xanthus* Protox transgenic lines with marker free; AP31-37, Arabidopsis Protox transgenic lines; H41-48, human Protox transgenic lines.
[b]DAS, days after seeding.
[c]Means within columns followed by the same letter were not significantly different at P=0.05.

라서 형질전환 라인간에 활성산소종 발생량에서 유의적인 차이가 없었던 것처럼 이들을 소거하는 항산화효소에서도 일관성을 관찰 할 수 없었다.

비록 형질전환라인간에 단백질량(표 8)에는 유의적인 차이가 인정되지 않았으나 Protox 유전자 과다발현 형질전환 벼의 생장 저해가 Protox 유전자 도입에 의한 유독단백질 생산에 의해 기인될 수 있기 때문에 추후에 검토가 필요로 할 것으로 사료된다.

ALA 및 Chlorophyll 합성 능력

Porphyrin 생합성 경로의 초기단계의 ALA와 최종단계인 chlorophyll 합성능력을 형질전환벼를 대상으로 하여 파종 후 7일과 14일에 조사하였다(표 9). ALA 합성 능력은 파종 후 7일에는 TC, AP31, AP37, H48에서 비형질전환벼에 비해 유의적으로 증가하였으나 반면에 파종 후 14일에는 AP31, AP37, H41, H48에서 비형질전환벼에 비해 유의적으로 감소하였다. Chlorophyll 함량은 파종 후 7일째에 H41에서 유의적인 감소를 보였고, 파종 후 14일에는 AP31, H41, H48에서 비형질전한벼에 비해 유의적으로 증가하였다. Jung 등(2008)은 인간 Protox 과다발현 형질전환

Table 8. Comparative analysis of protein in leaves of *M. xanthus*, Arabidopsis, and human Protox transgenic lines.

Line[a]	Protein (μl/μg)	
	7 DAS[b]	14 DAS
WT	3.67[ab]	3.06[a]
TC	3.24[b]	3.07[a]
MX	3.70[ab]	3.07[a]
MX1	3.85[a]	3.02[a]
PX	3.73[ab]	2.97[a]
AP31	3.60[ab]	3.14[a]
AP37	3.32[b]	3.12[a]
H41	3.45[ab]	2.86[a]
H48	3.64[ab]	3.28[a]

[a]WT, wild type; TC, transgenic control; MX-MX1, *M. xanthus* Protox transgenic lines; PX, *M. xanthus* Protox transgenic lines with marker free; AP31-37, Arabidopsis Protox transgenic lines; H41-48, human Protox transgenic lines.
[b]DAS, days after seeding.
[c]Means within columns followed by the same letter were not significantly different at P=0.05.

벼 유묘에서 Proto Ⅸ와 Mg-Proto Ⅸ에 축적은 tetrapyrrole 생합성에 두 가지 주요한 변화에 기인된

Table 9. Comparative analysis of ALA synthesizing activities and chlorophyll in leaves of *M. xanthus*, Arabidopsis, and human Protox transgenic lines.

Line[a]	ALA (nmol/h/g FW)		Chlorophyll (mg/g FW)	
	7 DAS[b]	14 DAS	7 DAS	14 DAS
WT	147.06[c]	185.46[a]	345.1[ab]	335.7[bc]
TC	206.29[ab]	159.31[ab]	336.1[bc]	343.9[ab]
MX	172.39[abc]	187.50[a]	348.1[a]	332.5[c]
MX1	152.78[bc]	149.51[abc]	341.7[abc]	339.4[abc]
PX	174.84[abc]	155.23[ab]	338.9[abc]	340.5[abc]
AP31	212.42[a]	74.76[d]	345.4[ab]	348.3[a]
AP37	222.22[a]	93.55[bcd]	336.1[bc]	337.8[abc]
H41	183.82[abc]	82.11[cd]	333.6[c]	346.8[a]
H48	211.60[a]	100.49[bcd]	346.6[ab]	348.0[a]

[a]WT, wild type; TC, transgenic control; MX-MX1, *M. xanthus* Protox transgenic lines; PX, *M. xanthus* Protox transgenic lines with marker free; AP31-37, Arabidopsis Protox transgenic lines; H41-48, human Protox transgenic lines.
[b]DAS, days after seeding.
[c]Means within columns followed by the same letter were not significantly different at P=0.05.

다고 하였다. 첫째, 이들 포르피린 중간물질 축적은 ALA 합성능력이 증가하게 되고, 둘째, 엽록소와 heme 함량의 감소를 초래한다고 하였다. 그러나 본 연구의 인간뿐만 아니라 *A. thaliana* 및 *M. xanthus* Protox 과다발현 형질전환 벼의 많은 라인에서는 일정한 경향을 보이지 않았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 본 연구의 Protox 유전자 과다발현 형질전환 벼의 생육 및 생장량 감소 요인으로 고려 할 수 있는 첫 번째 이유로는 Protox 유전자 과다발현으로 인한 tetrapyrrole이 축적되기 때문인 것으로 생각된다. 두 번째 이유로 고려할 수 있는 요인은 제초제 저항성 계통의 생장이 plasmid DNA 복제에 필요한 에너지와 자원 때문에 더디게 진행될 수 있다는 것이다. 그러나 이 부분에 관한 연구는 이 연구에서 수행되지 않아 추후 검토가 요망된다. 셋째, 항생제 저항성 단백질에 발현은 숙주세포에 상당한 대사적 load를 수반할 수 있다. 본 연구에서 사용한 MX와 PX 라인간에 차이는 항생제 저항성 단백질 유무이다. 즉, PX는 항생제 저항성 marker 없는 형질전환 벼이다. 하지만 이 두 라인간 비슷한 생육을 보여 MX에서 대사적인 load가 PX보다 컸다고 단정할 수 없지만 추후 더 상세한 연구가 병행되어야 할 것이다. 넷째, 도입된 저항성 유전자들은 유독단백질 생산, 유독부산물 또는 적당한 대사적 기능에 간섭이 되는 어떤 방법들에 의해 생장률이 감소할 수 있다. 추후에 이 부분도 검증된다면 본 연구의 형질전환 작물의 생육저해 기작을 이해하는데 도움이 되리라 본다.

또한 Protox 유전자가 과다 발현된 형질전환 벼는 제초제 저항성을 구비하는 대신에 에너지 전환 이용상의 균형파괴에 따른 특정 환경 적응 및 이용효율에 차질을 일으킬 수 있기 때문에 생장의 기본요소인 온도, 광, 수분, 양분, CO_2 등에 대한 반응 특이성에 대한 연구가 필요로 하다. 따라서 Protox 유전자별 제초제 저항성 형질전환벼의 생생장량 감소는 어떤 단일 요인이라기보다는 위에서 언급한 여러 요인의 상호작용에서 야기될 것으로 해석된다.

요 약

본 연구의 목적은 다양한 생물종의 Protox 유전자 과다발현 제초제 저항성 형질전환 벼의 저항성 수준과 생육저해 원인이 생육시기별 tetrapyrrole 중간물질 축적과 대사 경로 물질, 활성산소 발생, 지질과산화 작용 및

항산화 효소 능력과 관련성이 있는지를 조사하는데 있다. *Myxococcus xanthus*(MX, MX1, PX), *Arabidopsis thaliana*(AP31, AP36, AP37) 및 인간(H45, H48, H49) Protox 과다발현 형질전환벼는 비형질전환벼에 비해 oxyfluorfen에 각각 43~65, 41~72 및 17~70배 저항성을 보였다. 다양한 생물종의 Protox 유전자 과다발현 제초제 저항성 형질전환 벼 중에 일부 라인은 다른 광조건하에서 정상적인 생육을 보인 반면에 일부 라인은 초장 및 생체중 감소가 야기되었다. 그러나 일관성 있게 파종 후 7일과 14일에 초장의 감소가 야기 되었던 형질전환 라인은 AP37뿐이었다. 또한 이들 형질전환 벼 라인들은 저광 및 암조건보다 고광조건하에서 초장 및 생체중 감소가 뚜렷하였다. 파종 후 7일째 Proto Ⅸ 축적은 AP31, AP37 및 H48에서 비형질전환벼에 비해 유의적으로 많았고, 파종 후 14일째에는 PX, AP37 및 H48에서 유의적으로 많았다. 파종 후 7일째 Mg-Proto Ⅸ은 일부 라인(H41과 H48)을 제외하고 그리고 Mg-Proto Ⅸ monomethyl ester는 MX, MX1, PX를 제외한 형질전환 라인 간에 차이가 없었다. 비록 terapyrrole 중간물질이 축적 되었더라도 이들 축적량은 Protox 과다발현 형질전환벼의 생육을 저해 하는데 충분하지 않았을 것으로 생각된다. 또한 활성산소종 (H_2O_2와 $O_2^{\cdot -}$), MDA, ALA 합성 및 엽록소 함량에서도 형질전환 라인간에 유의적인 차이가 인정되지 않아 tetrapyrrole 축적량이 형질전환 벼의 생육저해에 충분하지 못했음을 확인할 수 있었다. 따라서 일부 형질전환벼에서 초기 생육저해는 어떤 단일 요인에 기인되는 것보다 복합적인 요인에 의해 기인되는 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 연구재단 연구비 지원에 의해 수행된 연구임(2009-0071409).

인 용 문 헌

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Buege, J. A., and S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52:302-310.

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.

Duke, S. O., and C. A. Rebeiz. 1994. Porphyrin biosynthesis as a tool in pest management : an overview, in Porphyric pesticides : Chemistry, toxicology, and pharmaceutical applications, ed by Duke SO and Rebeiz CA, American Chemical Society, Washington, DC, USA, pp. 1-17.

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.

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.

Ha, S. B., S. B. Lee, D. E. Lee, J. O. Guh and K. Back. 2003. Transgenic rice plants expressing *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene show low herbicide oxyfluorfen resistance. Biologia Plantarum. 47:277-280.

Ha, S. B., S. B. Lee, Y. Lee, K. Yang, N. Lee, S. M. Jang, J. S. Chung, S. Jung, Y. S. King, S. G. Wi and K. Back. 2004. The plastidic *Arabidopsis* protoporphyrinogen IX oxidase gene, with or without the transit sequence, confers resistance to the diphenyl ether herbicide in rice. Plant Cell Environ. 27:79-88.

Hiscox, J. D., and G. F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissues without maceration. Can. J. Bot. 57:1332-1334.

Jacobs, J. M., N. J. Jacobs, T. D. Sherman and S.

O. Duke. 1991. Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organella and plasma membrane inriched fractions of barley. Plant Physiol. 97:197-203.

Jana, S., and M. A. Choudhuri. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquat. Bit. 12:345-354.

Jung, H. I., and Y. I. Kuk. 2007. Resistance mechanisms in protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenicrice. J. Plant Biol. 50(5):586-594.

Jung, H. I., Y. I. Kuk, K. Back and N. R. Burgos. 2008. Resistance pattern and antioxidant enzyme profiles of protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice. Pestic. Biochem. Physiol. 91:53-65.

Jung, S., Y. Lee, K. Yang, S. B. Lee, S. M. Jang, S. B. Ha and K. Back. 2004. Dual targeting of *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase into chloroplasts and mitochondria and high level oxyfluorfen resistance. Plant Cell Environ. 27:1436-1446.

Jung, S., H. J. Lee, Y. Lee, K. Kang, Y. S. Kim, B. Grimm and K. Back. 2008. Toxic tetrapyrrole accumulation in protoporphyrinogen Ⅸ oxidase-overexpressing transgenic rice plants. Plant Mol. Biol. 67:535-546.

Lee, H. J., S. B. Lee, J. S. Chung, S. U. Han, J. O. Guh, J. S. Jeon, G. An and K. Back. 2000. Transgenic rice plants expressing a *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene are resistant to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. Plant Cell Physiol. 41:743-749.

Lee, Y., S. Jung and K. Back. 2004. Expression of human protoporphyrinogen oxidase in transgenic rice induces both a photodynamic response and oxyfluorfen resistance. Pestic. Biochem. Physiol. 80:65-74.

Lee. H. J., M. V. Duke and S. O. Duke. 1993. Cellular localization of protoporphyrinogen-oxidizing activities of etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. Plant Physiol. 102:881-889.

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 the target for diphenyl ether herbicides. Biochem. J. 260:231-235.

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.

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.

[SAS] Statistical Analysis System. 2000. SAS/STAT Users Guide, Version 7. Cary, NC : Statistical Analysis Systems Institute, Electronic Version.

Scalla, R., and M. Matringe. 1994. Inhibitors of protoporphyrinogen oxidase as herbicides : diphenyl ethers and related photobleaching molecules. Rev. Weed Sci. 6:103-132.

Spychalla, J. P., and S. L. Desborough. 1990. Superoxide dismutase, catalase, and tocopherol content of stored potato tubers. Plant Physiol. 94:1214-1218.

Wang, A. G., and Luo, G. H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. Plant Physiol. Commun. 6:55-57.