

Protoporphyrinogen oxidase (Protox) 저해제 저항성 형질전환 벼의 적응성과 Porphyrin 생합성 경로물질과 관련성

윤영범¹, 권오도², 백경환³, 이도진⁴, 정하일⁵, 국용인^{1*}

Relationship of Fitness and Substance of Porphyrin Biosynthesis Pathway in Resistant Transgenic Rice to Protoporphyrinogen Oxidase (Protox) Inhibitor

Young Beom Yun¹, Oh-Do Kwon², Kyoungwhan Back³
Do Jin Lee⁴, Ha-Il Jung⁵ and Yong In Kuk^{1*}

ABSTRACT The objectives of this study were to investigate fitness difference in growth and rice yield in herbicide-transgenic rice overexpressing *Myxococcus xanthus* and *Arabidopsis thaliana* protoporphyrinogen oxidase (Protox) genes and non-transgenic rice. We also aimed to determine whether these fitness differences are related to ALA synthesizing capacity, accumulation of terapyrroles, reactive oxygen species, lipid peroxidation, and antioxidative enzymes at different growth stages of rice. Plant height of the transgenic rice overexpressing *M. xanthus* (MX) and *A. thaliana* (AP37) Protox genes at 43, 50, and 65 days after transplanting (DAT) was significantly lower than that of WT. Number of tiller of PX as well as MX and AP37 at 50 and 65 DAT was significantly lower than that of WT. At harvest time, culm length and yield of MX, PX and AP37 and rice straw weight of MX and AP37 were significantly low compared with WT. The reduction of yield in MX, PX, and AP37 was caused by spikelets per panicle and 1000 grain weight, ripened grain, spikelets per panicle, 1000 grain weight, and ripened grain, respectively. On the other hand,

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

² 전남농업기술원 쌀연구소, 520-715 전남 나주시 산포면 산제리 206-7(Jeonnam Agricultural Research and Extension Service, Naju 520-715, Korea).

³ 전남대학교 농업생명과학대학 분자생물공학전공, 500-757 광주광역시 북구 용봉동 300(Major in Molecular Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea).

⁴ 순천대학교 사범대학 농업교육과, 540-742 전남 순천시 중앙로 413(Department of Agricultural Education, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea).

⁵ 코넬대학교 작물토양학과(Department of Crop and Soil Sciences, Cornell University, NY, Ithaca 14853, USA).

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

(Received May 20, 2011; Examined May 31, 2011; Accepted June 10, 2011)

the reduction of yield in MX, PX, and AP37 was also observed in another yearly variation experiment. The reduction of rice growth in MX, PX, and AP37 was observed in seedling stage as well as growth duration in field. There were no differences in tetrapyrrole intermediate Proto IX, Mg-Proto IX and Mg-Proto IX monomethyl ester, reactive oxygen species (H_2O_2 and O_2^-), MDA, antioxidative enzymes (SOD, CAT, POX, APX, and GR) and chlorophyll between transgenic lines and wild type, indicating that accumulated tetrapyrrole intermediate and other parameters were not related to growth reduction in transgenic rice. However, ALA synthesizing capacity in MX, PX, and AP37 at one day after exposure to light and 52 DAT was significantly lower than that of WT. Further study is required to elucidate the mechanisms underlying the growth and yield difference between transgenic and WT lines.

Key words: itness; porphyrin biosynthesis; protox inhibitor; transgenic rice.

서 언

Porphyrin 생합성 경로에 관여한 많은 효소 중 protoporphyrinogen oxidase(Protox)가 작용점인 제조제는 diphenyl ether계를 비롯한 9개 계통에 27종의 제조제가 있다(Duke 등 1991). Protox 저해 제조제는 살초범위가 넓으나 선택성 폭이 매우 좁아서 과수원에 과수가 직접 접촉되지 않도록 국부처리를 하거나 이들 제조제에 상대적으로 내성을 보인 양파, 완두, 목화 등의 재배지에만 사용될 뿐 일반적으로 식물 종간에 선택성이 적어 작물 생육기에 제조목적으로 사용하기에는 어렵다(Scalla와 Matringe 1994). 이들 제조제의 선택성 결여 문제를 해결하기 위하여 제조제 내성 유전자를 작물에 도입하여 제조제 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 제조제에 저항성 형질전환 벼가 개발되었다. 이 중 *M. xanthus*(Jung 등 2010) Protox 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 벼는 담수직파와 이양 재배 논 포장에서도 oxyfluorfen과 oxadiazon 처리에도 높은 저항성을 보였다. 다른 *B. subtilis*, *A. thaliana* 및 *H. sapiens* Protox 과다 발현 형질전환

벼는 *M. xanthus* Protox 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 벼에 비해 낮은 저항성을 보였다(Ha 등 2003; Ha 등 2004; Jung 등 2004; Lee 등 2004). 이러한 저항성 차이는 Protox 유전자 종류, 세포내 유전자 표적위치 및 형질전환 계통에 따라 기인되는 것으로 보고되었다.

제조제 저항성 형질전환 벼 중에서 일부는 제조제에 대해 저항성을 보이면서 정상적인 생육과 phenotype을 보이지만(Lemontova와 Grim 2000), 반면에 일부 형질전환작물들은 유묘기 때까지만 생육저해 현상이 유발되어 후기에 회복되는 경우가 있고, 또 다른 형질전환 작물의 경우 유묘기 때부터 생육전반에 걸쳐 생육저해 현상이 수확기까지 지속되어 상당한 수량감소가 야기되었다(Kuk 등 2010; Jung 등 2008b). 이러한 생육저해와 수량감소를 야기하는 그 구체적인 기작에 관한 연구는 적은 편이다.

따라서 본 연구의 목적은 *A. thaliana* 및 *M. xanthus* Protox 유전자 과다발현 제조제 저항성 형질전환 벼의 생육저해와 이로 인해 수량감소가 벼의 생육초기부터 유발되는지 아니면 생육후기에 유발되는지를 알아보고, 아울러 그 원인이 tetrapyrrole 중간물질 축적과 대사 경로 물질, 활성산소 발생, 지질과산화작용 및 항산화효소 능력 차이와 관련이 있는지를 조사하는데 있다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 *A. thaliana*(Ha 등 2003) 및 *M. xanthus*(Jung 등 2004) Protox 유전자 과다발현 제초제 저항성 형질전환벼와 비형질전환벼(동진)를 사용하였다. *A. thaliana* Protox 유전자 과다발현 형질전환벼 T4세대 1계통(AP37)과 *M. xanthus* Protox 유전자가 과다발현 형질전환벼 T9세대 1계통(MX)과 항생제 저항성 유전자가 없는 *M. xanthus* 유전자가 과다 발현한 형질전환 벼 T4세대 1계통(PX)을 사용하였다.

형질전환벼의 생장특성

본 연구는 2년에 걸쳐 수행되었으며 1년차에는 위의 Protox 저해제 저항성 형질전환 계통 MX, PX, AP37과 비형질전환벼 동진벼(WT) 종자를 소독하고 침종한 후 육묘상자에 파종 후 25일묘를 이양하여 이양 후 43, 50, 65일에 초장과 분얼수 그리고 수확기에 수량구성 요소(이삭수, 영화수, 등숙율, 천립중)를 조사하였다. 2년차에는 이들 형질전환벼의 적응성 차이가 벼 생육초기 및 후기에 차이가 있는지를 알아보기 위하여 수도용상토로 충진된 소형포트(150ml)에 각각 3립의 종자를 파종하고, 주야간의 평균온도 30/25℃, 상대습도 65/80%의 생장상의 암조건에서 3일간 둔 후 동일 생장상의 광(200μmol m⁻² s⁻¹ PPF) 조건하에서 0, 1, 3, 5, 11일에 초장과 지상부 생체중을 조사하였다. 이들 계통들을 파종 후 11일째에 포장에 이양하여 이양 후 21, 30, 43, 52일에 초장, 지상부 생체중 및 분얼수를 조사하였고, 수확기에 벼 수량구성 요소(이삭수, 영화수, 등숙율, 천립중)를 조사하였다.

형질전환벼의 tetrapyrrole 중간물질 축적

Protox 유전자 형질전환벼의 종자를 침종 및 최아한 후 수도용 육묘상토에 파종 후 주야간의 평균온도 30/25℃, 상대습도 65/80%의 생장상의 암조건에서 3일간 둔 후 동일 생장상의 광(200μmol m⁻² s⁻¹ PPF) 조건하에서 0, 1, 3, 5, 11일과 11일째 포장에 이양하여 이양 후 52일에 porphyrin 생합성 경로에 관련된

물질을 조사하였다.

ALA 합성 능력

Protox 유전자 형질전환벼와 비형질전환벼 엽 절편에 대한 ALA 합성능력은 Ehrlich's 시약을 이용한 Lermontova와 Grimm (2000)의 방법에 의해 수행되었으며 ALA 정량은 표준 ALA 농도에 의해 얻어진 직선회귀에 의해 계산하였다. 기타 자세한 방법은 Kuk 등(2010)의 방법에 준하여 실시하였다.

Porphyrin 중간물질 분석

Protox 유전자 형질전환벼와 비형질전환벼 엽 절편(0.1g)을 막자사발에 넣고 2ml의 methanol : acetone : 0.1N 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 -75℃의 냉동고에 보관하였다. Porphyrin 중간물질인 protoporphyrin IX(Proto IX), Mg-protoporphyrin IX(Mg-Proto IX)와 Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester(Mg-Proto Me IX)는 Lermontova와 Grimm (2000)의 방법에 의해 분석하였다. 기타 구체적인 분석방법은 Kuk 등(2010)의 방법에 준하여 실시하였다.

형질전환벼와 비형질전환벼의 생화학적 반응 차이 활성산소 발생

각 생육시기별 형질전환벼와 비형질전환벼에서 생성된 O₂⁻는 Wang와 Luo(1990)의 방법에 준하여 hydroxylamine 산화정도로 측정하였다. H₂O₂ 함량은 Jana와 Choudhuri(1981)의 방법에 준하여 분석하였고, 기타 구체적인 분석방법은 Kuk 등(2010)의 방법에 준하여 실시하였다.

세포막 지질과산화작용

각 생육시기별 형질전환벼와 비형질전환벼의 지질과산화작용은 thiobarbituric acid(TBA)방법을 이용하여 malondialdehyde(MDA) 생성량을 측정하여 조사하였다(Buege와 Aust 1978).

엽록소 함량 측정

각 생육시기별 형질전환벼와 비형질전환벼의 엽질편(100mg)을 채취하여 시험관에 넣고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 용매로 하여 48시간 동안 암상태에서 엽록소를 추출한 다음 분광광도계로 645와 663nm에서 흡광도를 측정하여 엽록소 함량을 계산하였다(Hiscox와 Israelstam 1979).

형질전환벼와 비형질전환벼의 항산화효소 활성 분석

형질전환벼와 비형질전환벼 잎을 각각 0.5g 수확하여 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 2mM EDTA, 1% PVP-40 및 1mM PMSF가 첨가된 100mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) 3ml로 균질화하여 15,000g로 20분간 원심분리한 다음 상정액을 항산화효소 분석에 사용하였다(Kuk 등 2010). Superoxide dismutase(SOD) 활성은 550nm에서 1분당 0.025 정도로 흡광도가 증가될 수 있도록 충분한 양의 xanthine oxidase와 조효소액을 넣어 흡광도 감소율로 활성을 측정하였다(Spychalla와 Desborough 1990). Catalase(CAT) 활성은 Mishra 등(1993)의 방법에 의해 측정하였고, Peroxidase(POX) 활성은 효소 추출액을 넣고 470 nm에서 guaiacol 발생량으로 측정하였다(Egley 등 1983). Ascorbate peroxidase (APX)의 활성은 ascorbate의 산화 정도를 290nm에서의 흡광도 감소로 측정하였고(Chen와 Asada 1989), Gluthathione reductase(GR)의 활성은 Rao(1996)의

방법에 따라 분석하였다. 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

형질전환벼와 비형질전환벼의 생육특성

M. xanthus(MX, PX) 및 *A. thaliana*(AP37) Protox 과다발현 형질전환벼는 비형질전환벼(WT)에 비해 Protox 저해제인 oxyfluorfen에 높은 저항성을 보였다(Kuk 등 2010; Jung과 Kuk 등 2007; Jung 등 2008a). 이들 형질전환벼와 비형질전환벼 종자를 동일한 조건하에서 파종하여 육묘한 후 포장에 이양 후 초장과 분얼수를 조사하였다(표 1). MX와 AP37의 초장은 이양 후 43, 50, 65일에 비형질전환벼에 비해 유의적으로 작았으나 PX와 비형질전환벼간에는 유의적인 차이가 없었다. 분얼수는 이양 후 43일에 PX와 AP37에서 비형질전환벼에 비해 적었으나 MX는 비형질전환벼와 유의적인 차이는 없었다. 그러나 이양 후 50일과 65일에 분얼수는 MX뿐만 아니라 PX, AP37에서 비형질전환벼에 비해 유의적으로 적었다.

Table 1. Comparison of plant height and number of tiller in wild type and transgenic rice plants under field conditions in 2009.

Line ¹⁾	Plant height (cm)			No. of tiller		
	43 DAT ²⁾	50 DAT	65 DAT	43 DAT	50 DAT	65 DAT
WT	49.9 ^{a3)}	71.5 ^a	75.9 ^a	13.7 ^a	14.0 ^a	14.6 ^a
MX	44.1 ^{bc}	64.0 ^b	67.7 ^b	10.9 ^{ab}	11.2 ^b	11.7 ^b
PX	47.4 ^{ab}	69.4 ^a	73.1 ^a	9.5 ^b	11.1 ^b	11.5 ^b
AP37	41.5 ^c	57.7 ^c	63.8 ^b	8.3 ^b	9.9 ^b	10.4 ^b

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Protox transgenic line; PX, *M. xanthus* Protox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* Protox transgenic line.

²⁾DAT, days after transplanting.

³⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at $P=0.05$.

Table 2. Comparison of yield component in wild type and transgenic rice plants under field conditions in 2009.

Line ¹⁾	Yield component						
	Culm length (cm)	Dry weight of rice straw (g)	Panicles per plant	Spikelets per panicle	Ripened grain (%)	1000 grain weight (g)	Yield (kg/10a)
WT	101.8 ^{a2)}	42.9 ^a	13.3 ^a	141.7 ^a	93.0 ^a	26.1 ^a	697.1 ^a
MX	87.2 ^c	25.5 ^b	12.1 ^a	119.6 ^b	87.4 ^{ab}	24.6 ^b	535.8 ^b
PX	94.3 ^b	41.5 ^a	12.3 ^a	134.3 ^{ab}	78.8 ^c	26.5 ^a	584.8 ^b
AP37	80.3 ^d	24.8 ^b	12.7 ^a	91.9 ^c	84.5 ^{bc}	24.7 ^b	544.0 ^b

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Prottox transgenic line; PX, *M. xanthus* Prottox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* Prottox transgenic line.

²⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at $P=0.05$.

형질전환벼가 비형질전환벼에 비해 초장과 분얼수가 적었던 것이 수확기의 간장, 고건중 및 수량구성요소에도 영향을 미치는지를 조사하였다(표 2). 수확기의 간장은 MX, PX 및 AP37에서 그리고 고건중은 MX와 AP37에서 비형질전환벼에 비해 유의적으로 적었다. 형질전환벼 계통 MX, PX 및 AP37은 비형질전환벼에 비해 유의적으로 수량이 감소하였으나, 이러한 수량감소는 MX의 경우 영화수와 천립중 감소에 의해, PX는 등숙율 감소에 의해, AP37은 영화수, 등숙율 및 천립중의 감소에 의해서 기인되었다. 그러나 수량구성요소 중 이삭수는 형질전환 계통과 비형질전환벼와의 차이가 없었다.

이들 Prottox 저해제 저항성 형질전환벼 계통이 비형질전환벼에 비해 생육 및 수량에 차이가 나는 것이

종자파종 후 암상태에서 최아시켜 광에 노출한 후부터 유평기에 진전되는지 아니면 이앙 후 생육후기에 진전되는지를 알아보기 위하여 생육시기별로 초장, 생체중 및 분얼수를 조사하였다(표 3과 4). 초장의 경우 파종 후 암상태에서 3일간 둔 경우와 광노출 후 1일과 3일에는 AP37에서만 비형질전환벼에 비해 유의적으로 작았다(표 3). 그러나 광노출 후 5일과 11일에는 AP37 뿐만 아니라 MX도 비형질전환벼에 비해 초장이 유의적으로 적었다. 또한 파종 후 11일에 이들 형질전환벼 계통과 비형질전환벼를 포장에 이앙하여 21, 30, 43 및 52일에 초장을 조사하였다(표 3). 광노출 5일과 11일 후에 MX에서 초장감소는 포장조건하에서는 나타나지 않았다. 그러나 AP37은 포장조건(이앙 후 21, 30, 43 및 52일)하에서도 일관성있게

Table 3. Comparison of plant height in wild type and transgenic rice plants under growth chamber and field conditions in 2010.

Line ¹⁾	Plant height (cm)								
	0 DAE ²⁾	1 DAE	3 DAE	5 DAE	11 DAE	21 DAT	30 DAT	43 DAT	52 DAT
WT	3.1 ^{a3)}	4.8 ^a	9.7 ^a	11.9 ^a	24.7 ^a	38.2 ^{ab}	44.3 ^a	68.2 ^a	80.8 ^a
MX	3.4 ^a	5.2 ^a	9.3 ^a	10.0 ^{bc}	22.8 ^b	35.8 ^b	43.6 ^a	68.1 ^a	77.6 ^a
PX	3.2 ^a	4.4 ^a	8.9 ^a	10.6 ^{ab}	22.0 ^b	38.9 ^a	45.4 ^a	70.7 ^a	78.0 ^a
AP37	2.8 ^b	3.3 ^b	5.1 ^b	8.9 ^c	16.1 ^c	33.1 ^c	40.2 ^b	56.4 ^b	68.1 ^b

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Prottox transgenic line; PX, *M. xanthus* Prottox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* Prottox transgenic line.

²⁾DAE, days after exposure in light ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under growth chamber; DAT, days after transplanting.

³⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at $P=0.05$.

Table 4. Comparison of shoot fresh weight and number of tiller in wild type and transgenic rice plants under growth chamber and field conditions in 2010.

Line ¹⁾	Shoot fresh wt. (g/plant)						No. of tiller		
	0 DAE ²⁾	1 DAE	3 DAE	5 DAE	11 DAE	52 DAT	21 DAT	30 DAT	43 DAT
WT	0.018 ^{a3)}	0.022 ^a	0.039 ^a	0.062 ^a	0.155 ^a	74.7 ^a	5.0 ^a	8.2 ^a	12.4 ^a
MX	0.015 ^a	0.025 ^a	0.034 ^a	0.051 ^b	0.134 ^b	72.4 ^a	4.3 ^b	9.3 ^a	12.9 ^a
PX	0.016 ^a	0.022 ^a	0.038 ^a	0.065 ^a	0.159 ^a	74.4 ^a	4.5 ^{ab}	8.6 ^a	12.0 ^a
AP37	0.018 ^a	0.016 ^b	0.022 ^b	0.047 ^b	0.110 ^c	42.2 ^b	3.4 ^c	6.4 ^b	9.9 ^b

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Prottox transgenic line; PX, *M. xanthus* Prottox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* Prottox transgenic line.

²⁾DAE, days after exposure in light (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under growth chamber; DAT, days after transplanting.

³⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at $P=0.05$.

비형질전환벼 뿐만 아니라 형질전환벼 계통 MX 및 PX에 비해 유의적으로 작았다.

한편 형질전환벼 계통과 비형질전환벼의 초기 및 후기 생육에 차이를 알아보기 위하여 지상부 생체중과 분얼수를 조사하였다(표 4). 초장의 결과와 유사하게 MX의 지상부 생체중은 광노출 후 5일과 11일에 그리고 AP37은 광노출 후 1, 3, 5 및 11일에 비형질전환벼에 비해 유의적으로 적었다. 그러나 이앙 후 52일에는 단지 AP37에서만 비형질전환벼에 비해 1.8배 적었을 뿐 비형질전환벼와 다른 형질전환벼 계통간에는 유의적인 차이가 없었다. 분얼수의 경우 MX는 이앙 후 21일에 비형질전환벼에 비해 유의적으로 감소하였으나 이앙 후 30일과 43일에는 차이가 없었다. 그러나 AP37은 초장 및 지상부 생체중의 감

소 뿐만 아니라 이앙 후 21, 30 및 43일에 조사한 분얼수에서도 비형질전환벼에 비해 유의적으로 감소하였다. 수확기의 간장은 형질전환벼 계통 MX와 AP37에서 고건중은 MX, PX 및 AP37에서 비형질전환벼에 비해 유의적으로 감소하였다(표 5). 형질전환벼 계통의 수량은 MX, PX 및 AP37에서 비형질전환벼에 비해 유의적으로 적었고 특히 AP37은 비형질전환벼에 비해 약 38% 감소하였다. MX는 영화수에 의해 PX는 영화수 및 등숙율에 의해 AP37은 영화수, 등숙율 및 천립중의 감소에 의해 수량이 감소하였다. 이러한 경향은 1년차 연구와 유사한 경향을 보였다.

비록 본 연구와 유전자가 다를지라도 *bar* 유전자가 도입된 제초제 저항성 형질전환벼의 경우 비형질전환벼에 비해 영화수, 간장 등의 농업적 특성에서 열등

Table 5. Comparison of yield component in wild type and transgenic rice plants under and field conditions in 2010.

Line ¹⁾	Yield component						
	Culm length (cm)	Dry weight of rice straw (g)	Panicles per plant	Spikelets per panicle	Ripened grain (%)	1000 grain weight (g)	Yield (kg/10a)
WT	109.5 ^{a2)}	106.8 ^a	12.6 ^a	126.1 ^a	82.6 ^a	28.14 ^a	580.8 ^a
MX	99.3 ^b	64.5 ^c	12.6 ^a	110.8 ^b	82.9 ^a	26.93 ^a	451.9 ^{bc}
PX	108.5 ^a	83.9 ^b	12.0 ^a	104.9 ^b	73.1 ^b	28.47 ^a	455.8 ^b
AP37	93.8 ^c	54.5 ^c	12.8 ^a	92.4 ^c	71.2 ^b	24.70 ^b	357.3 ^c

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Prottox transgenic line; PX, *M. xanthus* Prottox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* transgenic line.

²⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at $P=0.05$.

Table 6. Comparative analysis of tetrapyrroles in leaves of *M. xanthus* and *A. thaliana* Prottox transgenic lines.

Line ¹⁾	Proto IX (µg%)				Mg-Proto IX (µg%)			
	1 DAE ²⁾	3 DAE	5 DAE	52 DAT	1 DAE	3 DAE	5 DAE	52 DAT
WT	48.09 ^{a3)}	52.97 ^a	54.83 ^a	167.81 ^a	2.05 ^a	2.10 ^a	0.044 ^b	0.036 ^b
MX	76.12 ^a	37.07 ^b	41.30 ^a	159.91 ^a	2.15 ^a	1.60 ^b	0.040 ^b	0.069 ^a
PX	72.96 ^a	23.57 ^c	35.49 ^a	205.47 ^a	1.34 ^a	1.47 ^b	0.050 ^b	0.058 ^a
AP37	54.41 ^a	22.94 ^c	26.50 ^a	250.56 ^a	1.92 ^a	1.21 ^c	0.141 ^a	0.063 ^a

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Prottox transgenic line; PX, *M. xanthus* Prottox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* Prottox transgenic line.

²⁾DAE, days after exposure in light (200µmol m⁻² s⁻¹) under growth chamber; DAT, days after transplanting.

³⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at *P*=0.05.

한 경향을 보였다(Jeong 등 2005). 또한 neomycin phosphotransferase II(*npII*) 유전자가 도입된 형질전환 벼의 경우도 비형질전환 벼에 비해 지엽이 짧고, 출수가 지연되며 임성이 감소하여, 결국 이들 형질전환 벼는 비형질전환 벼에 비해 수장이 짧고 영화수가 적었다(Schuh 등 1993).

형질전환 벼의 tetrapyrrole 중간물질 축적

비형질전환 벼에 비해 형질전환 벼 계통에서 수량이 감소하였던 이유가 porphyrin 생합성 경로에 관련된 tetrapyrrole 물질 중 Proto IX, Mg-Proto IX과 Mg-Proto IX ME와 관련성이 있는지를 알아 보기 위하여 조사하였다(표 6 및 7). 형질전환 벼 계통과 비형질전환 벼의 Proto IX 함량은 광노출 후 1일, 3일 및 5일보다 이양 후 52일에서 약 2.1~4.6배 증가하였으나 형질전환 벼와 비형질전환 벼간에 차이가 없었다. 그러나 Mg-Proto IX은 광노출 후 1일째는 형질전환 벼 계통과 비형질전환 벼간에 유의적인 차이가 없었으나 광노출 후 3일째는 형질전환 벼 계통에서 비형질전환 벼에 비해 감소하였고 반면에 이양 후 52일에는 형질전환 벼 계통들이 비형질전환 벼에 비해 증가하였다.

그러나 광노출 후 5일째에는 AP37에서만 WT과 MX 및 PX에 비해 많았다. Mg-Proto IX은 Proto IX과 다르게 광노출 후 5일째와 이양 후 52일째에는 모든 형질전환 벼 계통과 비형질전환 벼에서 크게 감소하였다. AP37의 Mg-Proto IX ME은 광노출 후 3일

Table 7. Comparative analysis of tetrapyrroles in leaves of *M. xanthus* and *A. thaliana* Prottox transgenic lines.

Line ¹⁾	Mg-Proto IX ME (µg%)			
	1 DAE ²⁾	3 DAE	5 DAE	52 DAT
WT	10.98 ^{a3)}	14.61 ^a	1.533 ^a	0.138 ^a
MX	10.15 ^a	9.68 ^a	1.960 ^a	0.222 ^a
PX	9.75 ^a	11.67 ^a	1.734 ^a	0.253 ^a
AP37	10.53 ^a	8.67 ^b	2.083 ^a	0.148 ^a

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Prottox transgenic line; PX, *M. xanthus* Prottox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* Prottox transgenic line.

²⁾DAE, days after exposure in light (200µmol m⁻² s⁻¹) under growth chamber; DAT, days after transplanting.

³⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at *P*=0.05.

째에 다른 형질전환 벼 계통과 비형질전환 벼간에 비해 적었을 뿐 광노출 후 1일과 5일뿐만 아니라 이양 후 52일째에는 형질전환 계통과 비형질전환 벼와 유의적인 차이가 없었다. 그러나 모든 형질전환 벼 계통과 비형질전환 벼의 Mg-Proto IX ME 함량은 광노출 후 5일째에는 광노출 후 1일과 3일에 비해 5.1~9.5배 적었고, 이양 후 52일에는 광노출 후 1일과 3일에 비해 46.1~105.8배 감소하였다. 본 연구보다 세대경과 적은 *A. thaliana* 및 *M. xanthus* Prottox 유전자 과다 발현 형질전환 벼의 Proto IX은 비형질전환 벼에 비해 2~3배 높은 것으로 보고 된 바 있으나(Ha 등 2003; Jung 등 2004, 2008b; Lee 등 2004), 본 연구에서는

Table 8. Comparative analysis of H₂O₂ and O₂⁻ in leaves of *M. xanthus* and *A. thaliana* protox transgenic lines.

Line ¹⁾	H ₂ O ₂ (mmol/g FW)				O ₂ ⁻ (μmol/min/g FW)			
	1 DAE ²⁾	3 DAE	5 DAE	52 DAT	1 DAE	3 DAE	5 DAE	52 DAT
WT	2.08 ^{a3)}	4.82 ^a	5.01 ^{ab}	11.91 ^a	36.23 ^{ab}	31.72 ^{ab}	25.95 ^a	43.22 ^a
MX	1.87 ^a	4.81 ^a	5.58 ^a	12.72 ^a	37.71 ^a	28.08 ^b	32.52 ^a	41.69 ^a
PX	2.12 ^a	4.98 ^a	6.21 ^a	10.18 ^{ab}	30.16 ^b	32.49 ^{ab}	30.90 ^a	38.05 ^a
AP37	1.39 ^b	4.37 ^a	4.16 ^b	7.71 ^b	30.99 ^{ab}	35.07 ^a	31.76 ^a	39.51 ^a

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Prototox transgenic line; PX, *M. xanthus* Prototox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* Prototox transgenic line.

²⁾DAE, days after exposure in light (200 μmol m⁻² s⁻¹) under growth chamber; DAT, days after transplanting.

³⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at P=0.05.

유의적인 차이를 보이지 않았다. 비록 tetrapyrrole 중간물질의 축적정도는 형질전환체의 세대 및 벼의 생육시기별로 차이가 있을 수 있으나 형질전환체의 수량감소는 tetrapyrrole 중간물질 축적량과는 연관성이 적은 것으로 사료된다.

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 지질과 산화를 유도하고, 궁극적으로 세포를 죽게 한다 (Jacobs 등 1991). 비록 tetrapyrrole 중간물질 축적량이 형질전환체와 비형질전환체의 유의적인 차이가 없더라도 tetrapyrrole 중간물질 축적은 광과 분자산소 존재하에서 활성산소종을 발생시키고 이들 활성산소종에 의해 세포막의 지질과 산화를 유도하여 결과적으로 세포를 죽게 할 수 있다. 따라서 광노출 후 1, 3 및 5일과 이양 후 52일에 형질전환체 계통과 비형질전환체 H₂O₂, O₂⁻ 및 지질과산화 정도를 조사하였다(표 8, 표 9). H₂O₂ 함량은 AP37에서만 광노출 후 1일과 이양 후 52일에서만 유의적으로 적었을 뿐 다른 계통간에는 차이가 없었다(표 8). 또한 O₂⁻ 함량에서도 형질전환체 계통과 비형질전환체간에 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 따라서 광노출 후 벼 생육초기 및 생육중기에 발생한 활성산소종이 형질전환체 계통의 수량감소에 영향을 미쳤을 것으로 생각되지 않는다.

지질과산화지표인 MDA 함량은 PX의 경우는 광

Table 9. Comparative analysis of MDA production in leaves of *M. xanthus* and *A. thaliana* protox transgenic lines.

Line ¹⁾	MDA (mmol/g FW)			
	1 DAE ²⁾	3 DAE	5 DAE	52 DAT
WT	27.75 ^{a3)}	20.19 ^a	26.65 ^a	90.80 ^a
MX	27.05 ^a	18.83 ^{ab}	24.15 ^a	70.63 ^b
PX	20.10 ^b	16.88 ^{ab}	23.95 ^a	59.51 ^b
AP37	16.94 ^b	16.01 ^b	19.98 ^b	63.04 ^b

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Prototox transgenic line; PX, *M. xanthus* Prototox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* Prototox transgenic line.

²⁾DAE, days after exposure in light (200 μmol m⁻² s⁻¹) under growth chamber; DAT, days after transplanting.

³⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at P=0.05.

노출 1일에서만 다른 형질전환체 계통 MX와 비형질전환체에 유의적으로 감소하였고 광노출 후 3일과 5일에는 비형질전환체, MX 및 PX간에는 유의적인 차이가 없었다(표 9). 그러나 AP37의 MDA 함량은 광노출 후 1, 3 및 5일에 MX 및 PX와 비형질전환체에 비해 유의적으로 감소하였다. 한편 이양 후 52일에 MX, PX 및 AP37의 MDA 함량은 비형질전환체에 비해 유의적으로 감소하였다. 그러나 MDA 함량은 광노출 후 1, 3 및 5일보다는 이양 후 52일에 2.6~3.3배 많았으나 비형질전환체에 비해 형질전환체 계통에서 MDA 함량이 적어 형질전환체 계통에서 수량감소와 지질과산화 정도의 관련성은 없는 것으로 사

Table 10. Comparative analysis of ALA synthesizing activities and Chlorophyll in leaves of *M. xanthus* and *A. thaliana* protox transgenic lines.

Line ¹⁾	ALA (nmol/h/g FW)				Chlorophyll (mg/g FW)			
	1 DAE ²⁾	3 DAE	5 DAE	52 DAT	1 DAE	3 DAE	5 DAE	52 DAT
WT	1.25 ^{a3)}	2.12 ^a	3.13 ^{ab}	1.93 ^a	3.29 ^a	3.02 ^a	3.33 ^a	13.68 ^a
MX	0.83 ^b	1.99 ^a	2.72 ^b	1.65 ^b	2.92 ^a	2.78 ^a	2.88 ^a	14.84 ^a
PX	0.81 ^b	3.21 ^a	4.05 ^a	1.50 ^b	2.87 ^a	2.72 ^a	3.26 ^a	11.23 ^a
AP37	0.77 ^b	2.90 ^a	4.08 ^a	1.53 ^b	2.86 ^a	2.58 ^a	3.07 ^a	13.82 ^a

¹⁾WT, wild type; MX, *M. xanthus* Prottox transgenic line; PX, *M. xanthus* Prottox transgenic line with marker free; AP37, *A. thaliana* Prottox transgenic line.

²⁾DAE, days after exposure in light ($200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under growth chamber; DAT, days after transplanting.

³⁾Means within columns followed by the same letter were not significantly different at $P=0.05$.

표되었다.

MX, PX, AP37의 ALA 합성능력은 광노출 후 1일에는 비형질전환벼에 비해 유의적으로 감소하였으나 광노출 3일과 5일에는 계통간에 차이가 없었다(표 10). 그러나 벼의 생육후기에 해당되는 이앙 후 52일에는 MX, PX, AP37에서 ALA 생합성능력이 비형질전환벼에 비해 감소하였다. 형질전환벼 계통과 비형질전환벼의 엽록소 함량은 광노출 후 전 기간과 이앙 후 52일에도 유의적인 차이가 없었다(표 10). 하지만 광노출 후 1, 3 및 5일에 엽록소 함량은 이앙 후 52일 비해 훨씬 적었다. 형질전환벼 계통과 비형질전환벼 유묘를 광노출 후 1, 3 및 5일에 항산화효소 활성을 조사하였다(그림 1). 활성산소종을 소거할 수 있는 항산화효소(SOD, CAT, POX, APX, GR)의 무독화 능력도 형질전환벼 계통과 비형질전환벼간에 유의적인 차이가 없었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 본 연구의 Prottox 유전자 과다발현 형질전환벼에서 비형질전환벼에 비해 수량이 감소했던 이유로는 Prottox 유전자 과다발현으로 인한 porphyrin 생합성 경로의 tetrapyrrole 중간물질이 축적되었기 때문으로 생각되지 않는다. 왜냐하면 비록 중간물질의 종류에 따라 일부 중간물질은 벼 생육초기에 증가하고 일부 중간물질은 감소하였지만 중간물질 축적량은 형질전환벼 계통과 비형질전환벼에 비해 유의적인 차이가 없었기 때문이다. 또한 항생제 저항성 단백질의 발현은 숙주세포에 상당한 대사

적 장애를 수반할 수 있어 항생제 저항성 marker가 없는 형질전환 벼(PX)를 marker를 사용한 형질전환 벼(MX)와 수량 차이를 비교한 경우 marker가 없는 형질전환벼에서도 수량감소가 야기되어 항생제 저항성 단백질 발현에 의한 대사적 장애 때문에 수량이 감소했다고 단정할 수 없다. 하지만 porphyrin 생합성 경로 초기 물질인 ALA 합성능력은 형질전환벼계통에서 광노출 후 1일과 이앙 후 52일에 비형질전환벼에서 유의적으로 적은 것으로 보아 이 부분에 대한 상세한 연구가 추후에 수행되어야 할 것으로 보인다. 또한 tetrapyrrole 생합성 경로물질로 새로이 알려진 divinyl protochlorophyllide a는 세포고사 및 생장을 방해하는 것으로 알려지고 있다(Tanaka와 Tanaka 2007). 따라서 이 물질과 형질전환벼 계통에서 수량 감소와 관련이 있는지는 추후에 구명되어야 할 것이다. 또한 도입된 제초제 저항성 Prottox 유전자가 유독단백질 생산이나 유독부산물을 발생하여 형질전환벼 계통에서 수량이 감소될 수 있어 이 부분에 대한 연구가 추후에 수행된다면 형질전환 작물의 생육저해로 인한 수량감소 기작을 이해하는데 도움이 되리라 본다.

요 약

Myxococcus xanthus (MX, PX)와 *Arabidopsis thaliana* (AP37)의 protoporphyrinogen oxidase (Prottox)

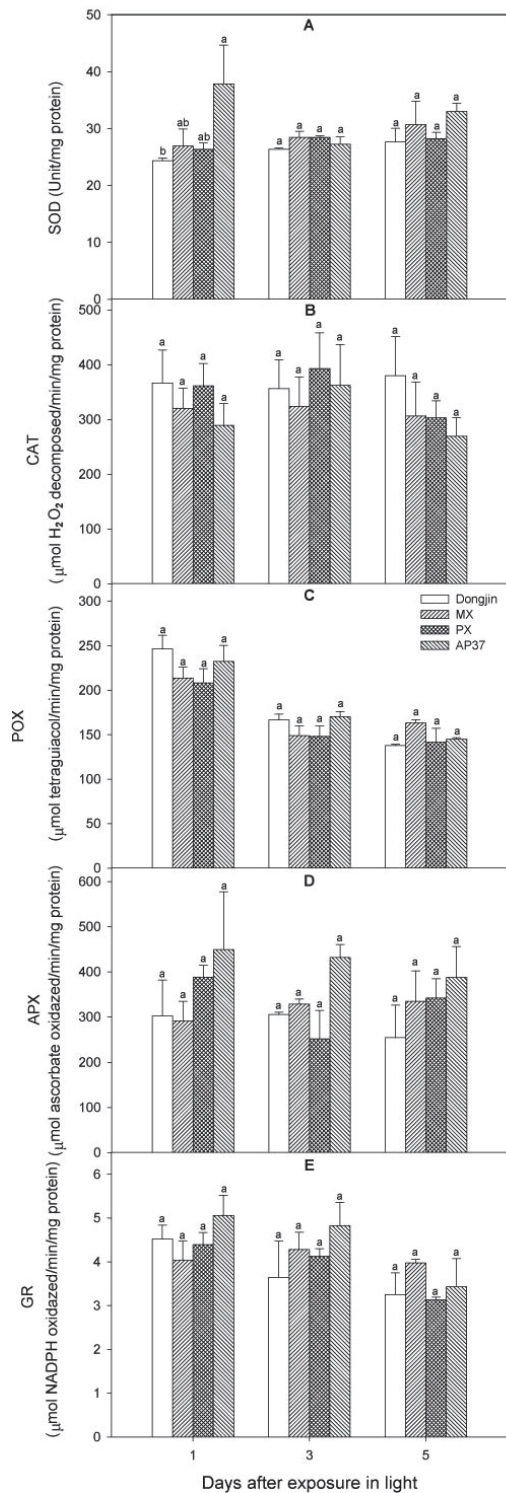


Fig. 1. Comparative analysis of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR) activities, expressed on a mg protein basis in leaves of *M. xanthus* and *A. thaliana* Protocx transgenic lines.

유전자 과다발현 제초제 저항성 형질전환 벼와 비형질전환벼의 생육 및 수량에 관한 적응성 차이와 벼 생육시기별 ALA 합성능력, tetrapyrrole 중간물질, 활성산소 발생, 지질과산화 작용 및 항산화효소 능력의 연관성이 조사되었다. Protocx 과다발현 형질전환 벼 MX와 AP37의 초장은 이앙 후 43, 50, 65일에 비형질전환벼 비형질전환벼에 비해 유의적으로 적었고, 분얼수는 이앙 후 50일과 65일에 MX와 AP37 뿐만 아니라 PX에서도 비형질전환벼에 비해 유의적으로 적었다. 수확기의 간장과 수량은 MX, PX 및 AP37에서 그리고 고건중은 MX와 AP37에서 비형질전환벼에 비해 유의적으로 적었다. 형질전환벼 계통 MX, PX 및 AP37의 수량감소는 MX의 경우 영화수와 천립중에 의해, PX는 등숙율에 의해, AP37은 영화수, 등숙율 및 천립중에 의해서 기인되었다. 한편, 형질전환벼 계통 MX, PX 및 AP37의 수량감소는 또 다른 년차변이 연구에서도 관찰되었다. 이러한 형질전환벼 계통의 생육 감소는 이앙 후 생육기간 뿐만 아니라 이앙 전 육묘기간 동안에서도 발생하여 결과적으로 수량이 감소되는 것으로 생각된다. Tetrapyrrole 중간물질 Proto IX, Mg-Proto IX 및 Mg-Proto IX monomethyl ester의 축적량, 활성산소종(H₂O₂와 O₂), MDA, 및 항산화효소(superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase) 및 엽록소 함량은 Protocx 유전자 과다발현 형질전환벼 계통과 비형질전환벼간에 유의적인 차이가 없어 이들 porphyrin 대사 경로 물질과 벼 생육 및 수량감소의 연관성은 적은 것으로 사료된다. 그러나 MX, PX, AP37의 ALA 합성능력은 광노출 후 1일과 이앙 후 52일에 비형질전환벼에 비해 유의적으로 감소하여 이 부분에 대한 상세한 연구가 추후에 수행되어야 할 것으로 보인다.

감사의 글

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

인용문헌

- 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., 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 enriched 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. Bot.* 12:345-354.
- Jeong, E. G., G. W. Yi, Y. J. Won, H. M. Park, N. S. Cheon, J. H. Choi, Y. C. Ku, C. D. Han, M. Y. Eun, T. S. Kim and M. H. Nam. 2005. Agronomic characteristics of transgenic japonica rice "Milyang 204" with herbicide resistance gene (bar). *Kor. J. Plant Biotechnol.* 32:85-90.
- Jung, H. I., and Y. I. Kuk. 2007. Resistance mechanisms in protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice. *J. Plant Biol.* 50(5):586-594.
- Jung, H. I., Y. I. Kuk, K. Back and N. R. Burgos. 2008a. 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. 2008b. Toxic tetrapyrrole accumulation in protoporphyrinogen IX oxidase-overexpressing transgenic rice plants. *Plant Mol. Biol.* 67:535-546.
- Jung, H. I., Y. I. Kuk, H. Y. Kim, K. Back, D. J. Lee, S. Lee and N. R. Burgos. 2010. Resistance levels and fitness of protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice in paddy fields. *Field Crops Research* 115:125-

- 131.
- Kuk, Y. I., J. S. Shin, Y. B. Yun and O. D. Kwon. 2010. Mechanism of growth inhibition in herbicide-resistant transgenic rice overexpressing protoporphyrinogen oxidase (Protox) gene. *Kor. J. Weed Sci.* 30:122-134.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schuh, W., M. R. Nelson, D. M. Bigelow, T. V. Orum, C. E. Orth, P. T. Lynch, P.S. Eyles, N. W. Blackhall, J. Jones, E. C. Cocking and M. R. Davey. 1993. The phenotypic characterization of R2 generation transgenic rice plants under field conditions. *Plant Sci.* 89:69-79.
- Tanaka, R., and A. Tanaka. 2007. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:321-346.
- Wang, A. G., and G. H. Luo. 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiol. Commun.* 6:55-57.