

## Paraquat 저항성 생태형 망초의 선발과 저항성 기작

김성은 · 김승룡 · 안설화 · 전재철\*

전북대학교 응용생물공학부 및 생리활성물질연구소.

**요약** : 생물검정과 RAPD 분석을 통해서 paraquat 저항성 생태형 망초를 선발하고, 저항성 발현 기구에 있어 paraquat의 흡수와 이행, 그리고 결합친화력 차이가 관여하고 있는지를 조사하였다. 생물검정에 의하여 선발한 paraquat 저항성 생태형 망초는 RAPD 분석 결과 감수성 생태형 망초와의 유전적 관계에 있어서는 서로 먼 유연관계에 있음이 확인되었다. 엽록소 함량을 50% 감소시키는 paraquat의 농도로 나타낸 저항성 지수는 저항성 생태형이 감수성 생태형에 비하여 약 7.8배 높았다. 저항성 및 감수성 생태형 간 epicuticular wax의 함량은 비슷한 수준이었고, cuticle의 함량은 저항성 생태형이 감수성 생태형에 비하여 약 1.5배 정도 높게 나타났지만, 이러한 차이는 cuticle을 통한 paraquat의 흡수량과 이행에 영향을 끼치지 않았다. 세포벽에 대한 결합친화력은 저항성 생태형이 감수성 생태형에 비하여 7.4배 높게 나타났으며, 엽록체포막에 대해서는 감수성 생태형이 저항성 생태형에 비하여 약 1.5배 높은 결합친화력을 보였다. paraquat의 주요 작용점인 thylakoid 막에 대한 결합친화력에서는 저항성 생태형이 감수성 생태형에 비하여 약 16.9배 정도의 차이를 나타내어 그 차이가 매우 크게 나타났다. 이상의 결과로부터 paraquat에 대한 망초의 저항성 기작은 paraquat의 세포막 및 thylakoid 막 결합에 의한 작용점으로부터 격리가 어느 정도 관여하고 있는 것으로 생각된다.(2005년 2월 16일 접수, 2005년 3월 23일 수리)

색인어 ; 격리, 결합친화력, 저항성 망초, paraquat, thylakoid.

### 서 론

Paraquat는 bipyridylum 계열의 화합물로서 비선택성, 접촉형 경엽처리 제초제이다. 이 제초제는 과수원, 비농경지 및 도로변 잡초 방제를 위하여 사용하거나 또는 작물 파종 및 이식 전에 이미 발생된 잡초의 제거와 후작물 재배를 위하여 선행 작물체를 빨리 건조 고사시키고자 처리하고 있다. 우리 나라에서는 이러한 특징 때문에 도입 이래로 매우 장기간에 걸쳐 광범위하게 사용되어 왔지만, 잔효성이 없어 약제 처리 효과가 오래 지속하지 않기 때문에 만족스러운 제초 효과를 얻기 위해서는 지속적인 반복 처리가 필요하다.

장기간에 걸친 paraquat의 연용 처리에 따른 저항성 잡초의 출현은 1981년 이집트에서 *Conyza bonariensis*로부터 처음 발견되어 보고(Youngman과 Dodge, 1981)된 이래로, 최근까지 계속해서 화본과 4종 및 12종의 광엽잡초 등 다양한 잡초종에서 확인되어 왔다(Preston, 1994). 우리 나라에서도 paraquat 저항성 초종은 오래 전부터 사용자들 사이에서 인지되어 왔었

며, 최근 망초에서 paraquat 저항성 생태형이 존재하고 있음이 보고된 바 있다(김과 황, 2000; 변 등, 2001).

Paraquat의 저항성 발현 기구에 대해서는 지금까지 매우 광범위하게 연구되어 왔음에도 불구하고 현재까지 단일 기구 만으로는 설명하지 못하였고, 단지 몇 가지 가설들만이 제시되어 왔다. Fuerst와 Vaughn(1990)은 paraquat 저항성에 대한 많은 연구 결과를 토대로 1) cuticle에 의한 침투 제한, 2) 식물체내에 흡수된 paraquat가 2가 양이온의 형태로 존재하기 때문에 작용점인 엽록체에 도달하기 이전에 세포 내 물질과의 흡착, 3) 세포 내 여러 양이온 등과 동일한 경로를 통하여 액포 등에 격리, 4) 작용점인 thylakoid막의 변형, 그리고 5) paraquat에 의하여 생성된 superoxide radical 등을 소거시키는 방어효소의 활성 증대 등에 의할 것이라는 가설들을 제안하였다. 이밖에도 paraquat의 반복 노출에 의하여 출현된 저항성 초종들이 형태적 또는 생리적 특성에 따라 매우 다양한 저항성 기작을 보일 것으로 생각되어, 초종에 따라서는 다각적인 연구 방법의 채택 및 접근이 필요할 것이 요구되고 있다.

Paraquat는 식물체의 광합성 광반응 중 ferredoxin에

\*연락저자

전달되는 전자를 탈취하여 이를 산소에 전달하고 이렇게 만들어진 활성산소(superoxide radicals)는 세포조직을 공격하거나, 또 다른 활성산소인 hydrogen peroxide 또는 hydroxyl radical로 전환되어 세포막을 파괴하고, 이에 따라 식물체는 수분이 손실되어 고사되는 살초 작용을 나타낸다. 따라서 paraquat 저항성 기구는 paraquat가 나타내는 살초 작용에 이르는 과정에서 어느 부분에서인가를 차단하여 살초 작용을 나타내지 못하게 함으로써 저항성을 일으킬 가능성을 생각할 수 있다.

이상과 같은 지금까지의 paraquat 저항성 연구를 토대로, 본 연구에서는 우리 나라에서 발견되고 있는 paraquat 저항성 망초에 대하여 RAPD 분석을 통해 감수성 망초와의 유전적 유연관계를 조사하였으며, 이들을 대상으로 paraquat의 흡수 및 이행 차이와, 작용점에 이르는 과정에서의 세포막, 엽록체막 및 thylakoid 막에 대한 결합 정도를 조사하여 이들의 결과가 paraquat 저항성 차이에 기여하고 있는지를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Paraquat 저항성 생태형 선발

다년간 paraquat를 사용한 배 과원(전주시 삼천동 소재)을 대상으로 2001년 5~6월 사이에 시판용 paraquat(파라코®, 24.5%)를 표준사용량 수준(2.5 mM)으로 처리한 후 망초에 대하여 90%이상의 살초 효과가 나타나는 시기에, 10%이하의 살초 효과를 보인 망초를 저항성 생태형(Resistance biotype)으로 선발하고, 90%이상의 살초 효과를 보인 망초를 감수성 생태형(Susceptible biotype)으로 일차 선발한 후 이들의 종자를 수집하였다. 선발된 저항성 및 감수성 생태형 망초 종자를 2002~2003년에 파종하여 얻은 개체에 대하여 살초 효과를 재 검정하면서 이후의 실험을 수행하였다.

### 2. 저항성 지수

Paraquat 망초 생태형의 저항성 지수( $ChI_{50}$ )는 paraquat 처리에 의한 엽록소 파괴 정도로 얻었다. 즉 망초 생엽을 cork borer를 이용하여 직경 8 mm의 엽 절편을 만든 다음 생체중 1 g을 1% sucrose를 함유한 MES(2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid) buffer 7 mL

가 담긴 시험관에 옮겼다. 엽 절편이 담긴 시험관 내 공기를 약 50 KPa의 압력으로 20분 동안 제거한 후에 1, 10, 100, 1,000 및 10,000  $\mu$ M의 paraquat를 처리하였다. 시험관 내의 엽 절편은 먼저 25°C의 생장상에서 12시간 동안 암 조건으로 배양한 다음 이어서 24시간 동안 120  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/s의 광을 조사하였다. 그 후 Hiscox와 Israelstam(1979)의 방법에 따라 엽록소 함량을 측정하였다. 즉 광 조사 후 시험관 내의 엽 절편을 배양액과 분리한 후 엽 절편에 남아있는 수분을 여과지(Whatman No.1)로 제거하고 다른 시험관에 옮겼다. 이 시험관에 10 mL의 dimethyl sulfoxide을 첨가한 후 실온의 암 조건에서 24시간 동안 침지시켰다. 추출된 엽록소는 분광 광도계(Beckman UV-52)를 이용하여 645 nm와 663 nm 파장에서 흡광도를 측정한 후 산출하고, 이 값으로부터 무처리 대비 엽록소 50%를 파괴하는 paraquat의 농도를 구하였다.

### 3. RAPD 분석

망초 생엽을 채취 직후 -20°C의 냉동기에 보관한 시료로부터 DNA를 추출하였다. 망초 생엽 0.1 g을 미리 저온에 보관하였던 막자사발에 넣고 해사 및 액체 질소와 함께 마쇄하고, DNA 추출 시약 I(RPN8511 Kits, Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire, England) 500  $\mu$ L를 가하였다. 이 시료를 1.5 mL용 tube로 옮겨 다시 추출 시약 II(RPN8511 Kits, Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire, England) 150  $\mu$ L를 가하였다. 이 시료를 가볍게 흔들어 섞은 다음 65°C의 수욕조에서 10분 동안 배양하고 이어서 15분 동안 얼음 속에서 냉각시켰다. 그 후 Nucleon resin (RPN8511 Kits, Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire, England) 100  $\mu$ L 및 -20°C의 냉동고에서 보관한 클로로포름 500  $\mu$ L를 가하고 실온에서 10분 동안 진탕한 다음 4°C, 1,000 g에서 10분 동안 원심분리하고, 계속해서 클로로포름만을 가하여 원심 분리한 후에 상등액 부분을 micropipette을 사용하여 microcentrifuge tube에 모았다. 이 상등액과 같은 양의 냉각된 isopropanol을 첨가한 후 가볍게 섞고 4°C, 1,000 g에서 5분 동안 원심 분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 버리고 DNA 침전물을 얻었다. 이 침전물을 차가운 70% 에탄올로 2회 세척하고 다시 4°C, 4,000 g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 조심스럽게 버리고 얻은 침전물을 실온에서 건조시킨 다음 100  $\mu$ L의 살균수에 용해시켰다.

Polymerase Chain Reaction(PCR)에 의한 Random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석은 Amersham Pharmacia Biotech사의 분석 bead Primer 1-2(Ready-To-Go™, Amersham Pharmacia Biotech, Inc. NJ, USA)를 이용하여 실시하였다. 먼저 bead를 20  $\mu$ L의 살균수에 용해시킨 다음 이 중 10  $\mu$ L를 500  $\mu$ L microcentrifuge tube에 넣고, RAPD primer 3  $\mu$ L, Template DNA 1  $\mu$ L를 첨가하여 가볍게 흔든 다음 약 40  $\mu$ L의 mineral oil을 첨가하였다. 이 시료를 minicycler(MJ Research Inc. USA)에 옮기고 다음 cycle profile에 따라 배양하였다. 즉 초기 melting은 95°C에서 5분간 진행시키고, 이어서 각 45 cycle을 melting 95°C에서 1분간, annealing 50°C에서 1분간 및 extension 72°C에서 2분간, 그리고 최후로 4°C에서 종결시켰다. 이 후 상층의 oil 부분을 조심스럽게 제거하였다.

PCR 후 전기영동은 1.5% agarose gel 상에서 20 mL TBE buffer를 이용하여 수행하였다. 전기영동 후 gel은 ethidium bromide (10 mg/mL)로 염색하고 5분 동안 증류수로 세척한 다음 UV-printgraph 상에서 DNA 밴드를 관찰하고 폴라로이드 필름으로 촬영하였다.

#### 4. [<sup>14</sup>C]Paraquat의 흡수

##### 1) Epicuticular wax 및 cuticle 함량

Epicuticular wax 및 cuticle의 추출은 Ricotta와 Masiusnas (1992)가 사용한 방법에 따랐다. 채취한 생엽(100 cm<sup>2</sup>)을 증류수로 2분간 세정한 후 흡습지로 수분을 제거한 다음 100 mL 용기에 옮기고, 총 100 mL의 정제된 클로로포름으로 두 차례(1회; 70 mL - 30초, 2회; 30 mL - 15초)에 걸쳐 세정하였다. 이어서 chloroform-wax 혼합액을 합친 후 여과(Whatman No.1)하여 미리 정량한 알루미늄 컵에 여과액을 받아 정제된 클로로포름 5 mL로 2회 반복하여 재정제하였다. 그 후 후드 내에서 48시간 동안 완전 건조시킨 후 알루미늄 컵을 재정량하여 cm<sup>2</sup> 엽면적당 epicuticular wax의 함량을 산출하여 비교하였다.

Cuticle은 엽 표면에서 wax층을 제거한 후에 추출하였다. Cuticle을 epidermal 세포로부터 분리하기 위하여 zinc chloride-hydrochloric acid 용액(1:1.7, w/v) 내에서 2~12시간 동안 정치시킨 후 잔류 엽 조직을 50 mL의 메탄올로 세정한 후 메탄올 5 mL로 2회 반복 세정하여 cuticle을 추출하였다.

이 후 메탄올 추출액을 epicuticular wax 실험에서와 같은 방법으로 증발시켜 cuticle 함량을 계산하였다.

특히 메탄올 추출액은 HCl 때문에 알루미늄 컵을 사용하는 대신 100 mL 비이커를 사용하였다.

한편 엽면적은 엽면적 측정계(Lambda, LI-3000)로 조사하였다.

##### 2) 처리엽에서의 [<sup>14</sup>C]paraquat의 흡수

과수원 포장에 발생한 망초에서 paraquat의 cuticle 흡수 정도를 검정하였다. [<sup>14</sup>C]Paraquat 3 kBq를 초정밀 분주기(Hamilton, PB-600)를 이용하여 엽 표면에 2  $\mu$ L씩 점적하고, 처리 후 24시간에 경엽부를 채취하여 2분간 증류수에 침지시킨 다음 건조시켰다. Cuticle 추출은 상기의 방법을 이용하여 행하였다. Cuticle을 통한 [<sup>14</sup>C]paraquat의 흡수량은 엽 표면에 남아있는 [<sup>14</sup>C]paraquat를 세척하여 얻어진 값을 총 처리량에서 뺀 값으로부터 산출하였다. 세척액 내의 방사능량은 liquid scintillation counter (Packard, TRI-CARB 300, USA)로 측정하였다.

#### 5. [<sup>14</sup>C]paraquat의 autoradiograph

망초 생태형 간 paraquat의 이행 차이를 확인하기 위해 처리엽에 3 kBq [<sup>14</sup>C]paraquat 10  $\mu$ L를 초정밀 분주기를 이용하여 점적하고, 24시간 동안 120  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/s의 조건에 노출시킨 후 처리엽을 채취하였다. 그 후 처리엽 표면에 남아있는 [<sup>14</sup>C]paraquat를 신속히 세정한 후 흡습지로 수분을 제거하고, 여과지에 부착시켜 후드 내에서 2주간 압착 건조시켰다. 건조된 시료를 암실에서 X-ray 필름(Kodak)에 4주간 밀착시켜 autoradiograph를 얻었다.

#### 6. 결합친화력

세포벽, 엽록체포막 및 thylakoid 막에 대한 paraquat의 결합친화력을 조사를 위한 모든 과정은 4°C 이하 온도에서 수행하였다. 세포벽 추출을 위하여 먼저 망초 생엽 5 g을 액체 질소를 사용하여 균질화하였다. 이를 100 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함한 100 mM tricine-KOH buffer(pH 7.8) 용액에 부유시킨 후 500  $\mu$ m mesh 크기의 체에 통과시켰다. 체를 통과한 부분을 2분 동안 sonication시켜 여과(Whatman No.1)하였다. 여과되지 않은 고형물을 증류수, 에탄올 그리고 증류수를 이용하여 차례로 씻어주었다. 물기를 제거한 후 세포벽을 25 mL의 증류수에 재부유시켰다. 이 중 5 mL를 65°C에서 48시간 동안 건조시켜 세포벽의 무게를 측정하

였고, 이 중 1 mL를 취하여 1, 4, 10, 20 및 30 nM 농도의 [ $^{14}$ C]Paraquat를 처리하여 1시간 동안 실온에 방치한 후 12,000 g에서 5분 동안 원심 분리 하였다. 상등액 200  $\mu$ L와 soluan 1 mL에 녹인 침전물 200  $\mu$ L 각각을 liquid scintillation counter를 이용하여 방사능량을 측정하였다.

엽록체포막 분리는 엽맥을 제거한 망초 생엽을 0.5 mm의 크기로 잘라 filtering Erlenmeyer 플라스크에 30 mL의 digestion medium으로 부유시키고, aspirator로 공기를 제거한 후 digestion medium (2% cellulase, 0.3% pectinase, 0.5 M sorbitol, 5 mM MES-KOH buffer(pH 5.5), 0.5% bovine serum albumin) 70 mL를 가하고 빛을 차단하여 25~30°C에서 2.5~3시간 동안 교반 시켰다. 이것을 500  $\mu$ m mesh 크기의 체에 통과시킨 후 160 g에서 5분 동안 원심분리하고, 침전물을 Medium 1(0.5 M sorbitol, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MES-KOH buffer(pH 6.0))로 부유시켜 500  $\mu$ m mesh 크기의 체에 통과시키고 같은 속도로 원심 분리 하였다. 원심 분리한 침전물을 냉각시킨 Medium 2(0.5 M sucrose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MES-KOH buffer(pH 6.0), 5~10 % (w/v) dextrin T40) 용액 5 mL로 부유시킨 다음 Medium 1용액 1 mL를 가하여 250 g에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 얻어진 침전물을 엽록체포막으로 이용하였다.

엽록체포막은 330 mM sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM DTT를 포함하는 50 mM Hepes buffer(pH 7.8) 용액 25 mL에 부유시키고, 이로부터 5 mL를 취하여 65°C에서 48시간 동안 건조시킨 후 엽록체의 무게를 측정하였으며, 1 mL를 취하여 1, 4, 10, 20 및 30 nM 농도의 [ $^{14}$ C]Paraquat를 처리하여 1시간 동안 실온에 방치한 후 12,000 g에서 5분 동안 원심 분리 하였다. 상등액 200  $\mu$ L와 soluan 1 mL에 녹인 침전물 200  $\mu$ L 각각을 liquid scintillation counter를 이용하여 방사능량을 측정하였다.

Thylakoid 막 분리를 위하여 망초 생엽 5 g을 액체 질소를 사용하여 균질화하였다. 이를 400 mM sorbitol과 5 mM ascorbate를 포함한 50 mM Tricine-KOH buffer(pH 8.0) 용액에 부유시켜 12겹의 cheesecloth로 여과하였다.

여과된 물질을 1,000 g에서 15분 동안 원심 분리한 후 침전물을 10 mM NaCl을 포함하는 100 mM Tricine-KOH buffer(pH 8.0) 용액에 재부유시켜 10,000 g에서 5분 동안 원심분리 하였다. Thylakoid 막인 침전물을 100 mM sorbitol과 10 mM NaCl을 포함하는

10 mM Tricine-KOH buffer(pH 8.0) 용액 2.5 mL에 재부유시켰다. 이 중 5 mL를 취하여 65°C에서 48시간 동안 건조시켜 thylakoid 막의 무게를 측정하였고, 1 mL를 취하여 엽록체포막 분리 실험과 동일한 방법으로 방사능량을 측정하였다.

## 7. 결합상수

[ $^{14}$ C]Paraquat의 세포벽, 엽록체 및 thylakoid 막에 대한 결합 정도는 각 추출물의 침전물에 대한 [ $^{14}$ C] paraquat의 결합량으로 산출하였다. 첨가한 [ $^{14}$ C] paraquat의 농도는 상등액에 포함되어 있는 유리 상태의 paraquat 양으로 간주하였다. 결합상수(specific binding constant)는 유리 상태의 paraquat와 결합된 paraquat를 모두 역수로 취하여 결합량은 y값으로, 유리된 양은 x값으로 plot하여 산출하였다. 새롭게 수정한 값, 즉 역수로 취한 값으로부터 얻은 직선식에서의 y절편 값을 [ $^{14}$ C]paraquat의 결합상수로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 저항성 생태형 선발과 생태형 간 유전적 유연관계

배 과원에서 잡초방제를 위하여 paraquat를 연간 2회 이상 지속적으로 처리해 온 포장으로부터 paraquat 저항성 망초를 선발하기 위하여 자생 망초에 paraquat를 처리한 후 경엽피해율 90% 이상이 나타난 개체와 10% 이하의 피해율을 보인 개체를 각각 paraquat 감수성 및 저항성 생태형으로 선발하고, 재료 및 방법으로 이들 개체로부터 종자를 수집하여 다시 과중 생

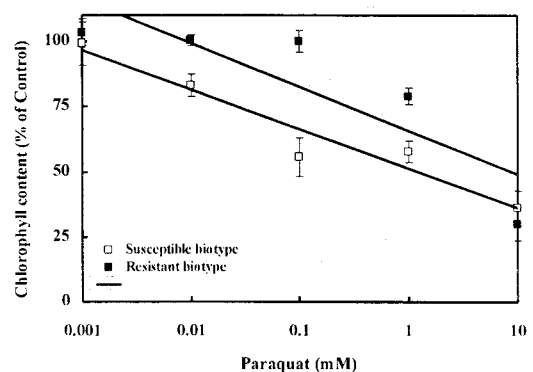


Fig. 1. Concentration-dependent chlorophyll contents in *Conyza canadensis* biotypes 24 hours after paraquat application.

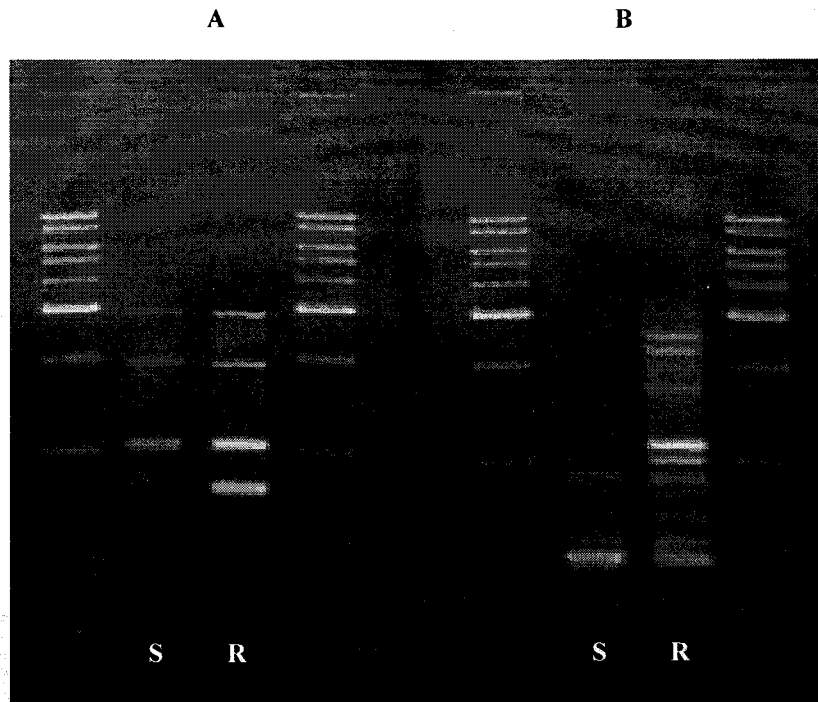


Fig. 2. RAPD analysis of *Conyza canadensis* DNA [Resistant and Susceptible biotypes] using 2 different primers (A, primer 1(5'-d[GGTGC GGAA]-3'); B, primer 2(5'-d[GTTCGCTCC]-3'). R, Resistant biotype; S, Susceptible biotype.

육시킨 후 이들 두 생태형에 대하여 paraquat 저항성 차이를 조사하였다. 즉 paraquat 약제를 처리하고 24 시간 후에 paraquat 처리 농도에 따른 엽록소 함량을 측정하고, 농도-엽록소 함량 반응곡선(그림 1)으로부터 paraquat에 의한 엽록소 50% 감소 농도( $Chl_{50}$ )를 산출하였다. 감수성 생태형에서의 paraquat 처리에 따른 엽록소 감소는 0.01 mM 처리 시 약 20%이었던 반면에, 저항성 생태형에서는 0.1 mM까지는 엽록소 감소가 전혀 나타나지 않았고 1 mM 처리 수준이 되어야 감수성 생태형에서 보였던 엽록소 감소 수준이 되었다. 그러나 고농도 처리 수준인 10 mM에서는 두 생태형 간 차이를 보이지 않아, 두 생태형 간 저항성 차이는 0.001 mM에서 1 mM 사이에 크게 나타났고, 1 mM 이상 농도에서 저항성 차이가 줄어드는 경향을 보였다. 한편 두 생태형 중 저항성 생태형의  $Chl_{50}$  값은 9.44 mM 이었으며, 감수성 생태형은 1.21 mM로,  $Chl_{50}$ 으로 본 저항성 지수는 7.8이었다.

제초제에 대한 잡초종의 반응은 동일 개체군 중에서도 각 개체들 간에 약제 처리에 따라 일시적으로 큰 변이를 보이기도 하여 저항성 개체로 잘못 판단되기도 한다. 따라서 paraquat 저항성 망초의 저항성이 유전적 변이에 따른 반응(Inherited ability)에서 유래된 것인지를 확인하는 것이 필요하다 (Maxwell과 Mort-

mer, 1994). 따라서 paraquat 두 생태형 망초 간 유전적 유연관계를 RAPD 분석에 의해서 검토하였다. 그 결과 primer 1에서는 800 bp(base pair)에서 저항성과 감수성 생태형 간 뚜렷하게 다른 염기쌍 밴드가 나타났으며, primer 2에서는 1,200 bp와 2,600 bp에서 다른 염기쌍 밴드가 나타났(그림 2).

이러한 결과는 저항성과 감수성 생태형 망초가 유전적으로 동일하지 않고 유연관계에 있어서 차이가 있는 것으로 볼 수 있으며, 따라서 저항성 생태형 망초의 paraquat에 대한 저항성은 이미 유전적으로 고정되어 있음을 나타낸 것으로 인정되었다.

## 2. Epicuticular wax 및 Cuticle 함량

제초 활성 발현은 일차적으로 식물체내로의 충분한 유효성분의 흡수가 전제되어야 한다. 경엽처리형 제초제에 있어서 식물체 엽 표면의 형태 및 조성은 제초제의 흡수량을 결정하는 중요한 요인이므로 경엽처리제에 대한 저항성 기작을 검정함에 있어서 경엽부의 epicuticular wax 및 cuticle에 의한 제초제 흡수 저해 여부를 확인하는 연구가 많이 이루어져 왔다(Chun 등, 2001). 따라서 paraquat 저항성 및 감수성 생태형 망초의 epicuticular wax 및 cuticle 함량을 조사하여 저

Table 1. Leaf property of *Conyza canadensis* biotypes and cuticular penetration of [ $^{14}$ C]paraquat

Biotype	Epicuticular wax ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Cuticle ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Amount penetrating cuticle (%)
Resistant	27.5 $\pm$ 1.6	445.4 $\pm$ 13.2	38.4
Susceptible	24.7 $\pm$ 2.2	294.1 $\pm$ 9.7	32.3

항성 기구와의 관련성을 검토하였다. 두 생태형의 엽 표면에서 추출한 epicuticular wax 함량은 큰 차이를 나타내지 않았으나, cuticle 함량은 저항성 생태형이 감수성 생태형에 비해 약 1.5배 정도 높았다(표 1). 그러나 엽 표면에 처리한 [ $^{14}$ C]paraquat가 epicuticular wax와 cuticle을 거쳐 식물체내로 침투한 양은 저항성 생태형에서는 38.4%, 감수성 생태형에서는 32.3%로, 그 차이는 6.1%에 불과하였다. 따라서 약 6% 정도의 paraquat 흡수 차이로 저항성 차이가 7.8배에 이르는 어려울 것으로 인정되었다. 결과적으로 두 생태형 간 epicuticular wax 및 cuticle 등 엽 표면의 특성은 paraquat에 대한 저항성 차이를 나타내는 제한 요소가 아닌 것으로 생각된다.

### 3. [ $^{14}$ C]paraquat의 이행

망초 생태형의 [ $^{14}$ C]paraquat 흡수 후 이행을 망초 경엽에 [ $^{14}$ C]paraquat를 처리하고 24시간 경과 후 동위 원소 처리 부위로부터의 이동 경로를 autoradiograph로

조사하였다. 잎 선단의 표면에 처리된 [ $^{14}$ C]paraquat는 최초 처리 부위에서 반점으로 나타났으며, 최초 반점 이외에 이행을 보여주는 다른 반점은 확인할 수 없었다(그림 3). 한편 이러한 현상은 저항성 및 감수성 생태형 망초에서 똑 같이 나타나서 그 차이를 찾을 수 없었다. 이상의 결과는 앞서의 흡수 결과와 함께 두 생태형의 엽 표면 특성이 paraquat의 흡수와 이행에 영향을 끼치지 못할 뿐만 아니라, 저항성 기구가 흡수와 이행에 의존하지 않고 있음을 확인시켜 준 결과 이었다. Paraquat가 식물체내로 흡수된 후 이행이 매우 제한된다는 현상은 이미 여러 식물체에서도 확인된 바 있다 (Kim과 Hatzios, 1994; Chun 등, 1997).

### 4. 결합 친화력

Paraquat 저항성과 감수성 망초 생태형의 생엽으로부터 추출한 세포벽, 엽록체포막 및 thylakoid 막에 대한 paraquat의 결합 친화력 차이를 검토하였다. 세포벽에 대한 paraquat의 결합은 감수성 생태형에 비해서

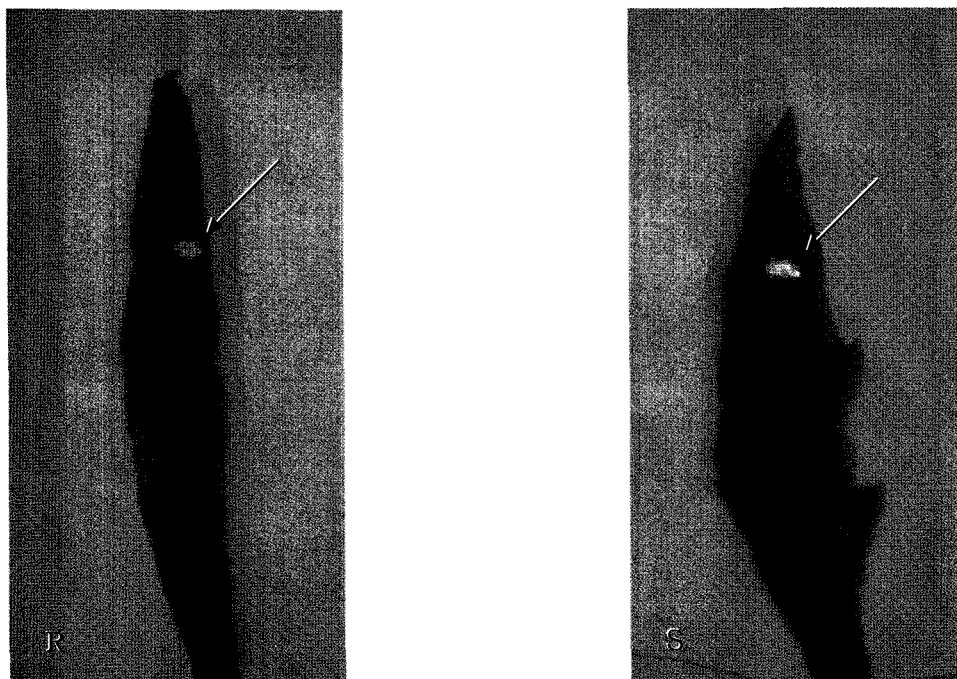


Fig. 3. Autoradiographs showing absorption and translocation of [ $^{14}$ C]paraquat in leaf of *Conyza canadensis* biotypes(R, Resistant biotype; B, Susceptible biotype). Arrow indicates application site of [ $^{14}$ C]paraquat.

저항성 생태형에서 높게 나타났다(그림 4). 즉 paraquat의 세포벽에 대한 결합상수(Binding constant)는 저항성 생태형이 62.5 nM이었던 반면에, 감수성 생태형에서는 8.47 nM로, 두 생태형 간 결합상수 차이는 약 7.4배 정도이었다. 이러한 차이는 paraquat의 세포벽에 대한 저항성 생태형의 친화력이 감수성 생태형에 비하여 매우 높은 것을 보여 준 결과이었다.

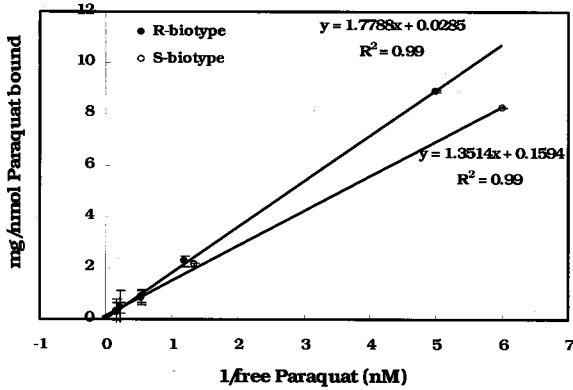


Fig. 4. Binding constant of [<sup>14</sup>C]paraquat to the cell wall purified from *Conyza canadensis* biotypes (R, Resistant; S, Susceptible).

한편 엽록체포막에 대한 paraquat의 결합 친화력에서는 두 생태형 간에 큰 차이를 나타내지 않았다(그림 5). 엽록체포막에 대한 paraquat의 결합상수는 저항성 생태형이 7.6 nM 이었고, 감수성이 11.5 nM이었다. 엽록체포막에 대한 결합상수는 세포벽에 대한 결합상수에 비해서 큰 차이가 없었지만, 감수성이 약 1.5배 정도 높게 나타났다.

그러나 paraquat의 주요 작용점인 thylakoid 막에 대한 paraquat의 결합 친화력은 저항성 생태형이 감수성

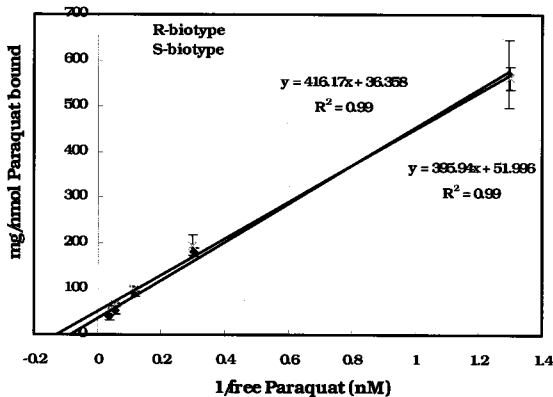


Fig. 5. Binding constant of [<sup>14</sup>C]paraquat to chloroplast envelop purified from *Conyza canadensis* biotypes (R, Resistant; S, Susceptible).

생태형에 비해 훨씬 높게 나타났다(그림 6). Thylakoid 막에 대한 결합상수는 저항성 생태형은 13.7 nM로, 감수성 생태형은 0.81 nM로 나타났다. Paraquat에 대한 저항성 생태형에서의 thylakoid 막에 대한 결합상수는 감수성 생태형에 비하여 약 16.9배 정도의 차이를 나타내어 그 차이가 매우 크게 나타났다. 또한 thylakoid 막에 대한 paraquat의 결합은 세포벽 및 엽록소에 대한 결합 정도와 비교할 때 저항성 생태형에서 비교적 높은 수준을 나타내었다.

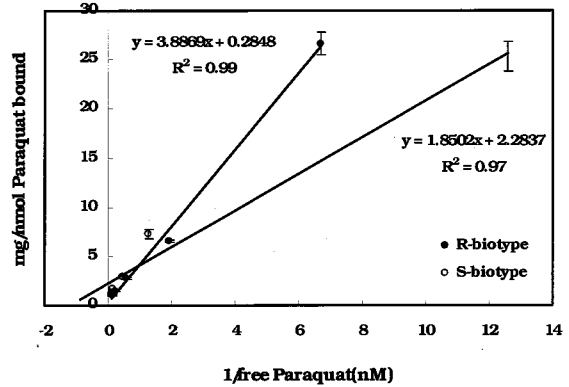


Fig. 6. Binding constant of [<sup>14</sup>C]paraquat to thylakoid membrane purified from *Conyza canadensis* biotypes (R, Resistant; S, Susceptible).

Paraquat 저항성 발현 기구는 지금까지 여러 가지 기구들이 제안되어 왔으나 이들 중 어느 것도 단일 기구로써 저항성 발현을 설명하지는 못하였다. 오히려 Fuerst와 Vaughn (1990) 및 Norman 등 (1993)은 paraquat 저항성이 발현된 식물 종이나 속 사이에서 하나 이상의 저항성 기구가 관여하고 있을 것이라고 제안한 바 있다. 한편 저자들은 paraquat에 내성을 보이는 저항에서의 내성 기구 구명을 위해서 저항성 기구로 제안된 여러 가지 가설들을 적용한 결과, 세포벽에 대한 paraquat 결합이 내성 부여에 어느 정도 기여하고 있음을 확인하였던 바 (Chun 등, 1997), paraquat 저항성 생태형인 망초에서도 감수성 생태형에 비하여 매우 높은 세포벽 결합친화력을 보이고 있음을 확인하였다. 더욱이 저항성 망초에 있어서는 감수성 망초에 비하여 paraquat 작용점인 thylakoid 막에 대한 결합친화력도 아주 높게 나타났는데, thylakoid 막에 대한 결합친화력은 세포벽 결합친화력에 비하여서 거의 두 배 이상 높게 나타났다. 그러나 엽록체포막에 대한 결합친화력에서는 두 망초 생태형 간에 큰 차이를 나타내지 않았는데, 이것은 아마도 두 생태형 모두 엽록체의 엽록체포막과 thylakoid 막에서의 결합

친화력 차이에서 후자에 대한 결합친화력이 더 크기 때문에 나타난 현상으로 생각한다. 이상의 결과들은 paraquat 저항성 망초에서의 저항성은 식물체에 처리된 paraquat가 흡수, 이행되어 작용점에 도달하는 과정에 세포벽 또는 thylakoid 막에서 paraquat의 결합으로 인하여 작용점으로부터 격리되는 현상 때문인 것으로 생각된다. 그러나 최근에는 생체 내의 항산화 물질이 paraquat가 나타내는 독성을 경감시키는 효과 (Suntres, 2002)가 주목되고 있는 바, 저항성 초종에서의 저항성 발현이 항산화 물질과의 상호작용력에 기인할 수 있다는 가능성이 예상되고 있기 때문에 향후 paraquat 저항성 망초의 저항성과 항산화 물질의 종류와 역할에 대한 관련성 연구가 더욱 필요할 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-1999-00172) 지원으로 수행된 것으로 이에 감사 드립니다.

### 인용문헌

- 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.
- Chun, J. C., S. Y. Ma, S. E. Kim, and H. J. Lee (1997) Physiological responses of *Rehmannia glutinosa* to paraquat and its tolerance mechanisms. *Pestic. Biochem. Physiol.* 59:51~63.
- Fuerst, E. P. and K. C. Vaughn (1990) Mechanisms of paraquat resistance. *Weed Technol.* 4, 150~156.
- Hiscox, J. D. and G. F. Israelstam (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissues without marceration. *Can. J. Bot.* 57:1332~1335.
- Kim, S. and K. K. Hatzios (1993) Competitive uptake, translocation, and metabolism of paraquat in tolerant Kwangkyo and susceptible Hood soybean. *Pestic. Biochem. Physiol.* 47:149~158.
- Maxwell, B. D. and A. M. Mortimer (1994) Selection for herbicide resistance. pp.1~25. In S. B. Powles and A. M. Holtum, eds. *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Norman, M. A., R. J. Smeda, and K. C. Vaughn (1993) Evaluation of paraquat resistance mechanisms in *Conyza*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46:236~249.
- Preston, C. (1994) Resistance to photosystem I disrupting herbicide. pp.61~82. In S. B. Powles and A. M. Holtum, eds. *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- 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.
- Suntres, Z. E. (2002) Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 180:65~77.
- Youngman, R. J. and A. D. Dodge (1981) On the mechanism of paraquat resistance in *Conyza* sp. pp.537~544. In G. Akoyunoglou, ed. *Photosynthesis. IV. Photosynthesis and Productivity, Photosynthesis and Environment*. Balaban International Science Service, Philadelphia, PA.
- 김희주, 황을철 (2000) Paraquat 저항성 망초의 protective 효소. *한국농화학회지* 43(1):46~51.
- 변종영, 박인철, 노석원 (2001) 한국에서 paraquat 저항성 망초의 출현 및 분포. *한잡초지* 21(1):27~32.



---

**Determination of paraquat-resistant biotype on *Conyza canadensis* and the resistant mechanism**Sung Eun Kim, Seung Yong Kim, Sul Hwa Ahn, and Jae Chul Chun<sup>a</sup>*(Faculty of Biotechnology and Research Center of Bioactive Materials, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea)*

**Abstract :** Paraquat-resistant biotype of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. was determined by chlorophyll loss and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and the resistant mechanism was investigated with respect to absorption, translocation, and binding constant. RAPD analysis for paraquat resistant (R) and susceptible (S) biotypes found in a pear orchard revealed that the biotypes possessed remote genetic relationship. Chlorophyll loss, as an indication of paraquat toxicity, of S biotype was 7.8-fold greater than that of R biotype. There were no differences in contents of epicuticular wax and cuticle and amounts of [<sup>14</sup>C]paraquat penetrating the cuticle between the two biotypes. Little translocation of the herbicide out of the treated leaf was observed in either biotype. Binding constants of paraquat to the cell wall and thylakoid membrane were 7.4-fold and 16.9-fold, respectively, higher in R biotype than in S biotype. The results suggest that the resistance mechanism of *C. canadensis* biotype is due partly to high binding affinity of paraquat to the cell wall and thylakoid membrane.

**Key words :** Paraquat-resistant biotype, *Conyza canadensis*, Resistant mechanism.

---

\*Corresponding author (Fax : +82-63-270-2550, E-mail : jcchun@chonbuk.ac.kr)