

해양 와편모조류 *Prorocentrum minimum*에 대한 아세트아닐라이드계 제초제 프레틸라클로르의 분자 생물학적 저해 효과

김한솔, 기장서*

상명대학교 생명공학과

Molecular physiological inhibitory effects of chloroacetanilide herbicide pretilachlor on marine dinoflagellate *Prorocentrum minimum*

Hansol Kim and Jang-Seu Ki*

Department of Biotechnology, Sangmyung University, Seoul 03016, Republic of Korea

***Corresponding author**

Jang-Seu Ki

Tel. 02-2287-5449

E-mail. kjs@smu.ac.kr

Received: 5 November 2021

Revised: 15 November 2021

Revision accepted: 16 November 2021

Abstract: Pretilachlor (PRE) is a common acetanilide herbicide used worldwide. However, its effects on aquatic organisms, particularly marine photosynthetic life, are not sufficiently known. Herein, we evaluated the toxic effects of PRE by physiological and molecular parameters in the photosynthetic dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. The cell density, pigment content, and photosynthetic parameters (F_v/F_m and PI_{ABS}) were considerably decreased with increased PRE exposure time and doses. In addition, photosynthesis-related genes, *Pmpsba*, *PmpsaA*, and *PmatpB*, were significantly upregulated when exposed to 1.0 mg L⁻¹ of PRE for 24 h ($p < 0.001$). In 72 h treatment, the relative gene expression was significantly increased (0.1 and 0.5 mg L⁻¹; $p < 0.01$). In contrast, *PmrbcL* was decreased or little changed compared to the controls. Reactive oxygen species (ROS) increased after 24 h exposure ($p < 0.001$). However, the transcriptional fold-changes in glutathione S-transferase (*GST*) were significantly increased (0.5 and 1.0 mg L⁻¹; $p < 0.001$) at 72 h. These findings suggested that the *PmGST* might be involved in PRE detoxification in *P. minimum*. In addition, PRE may affect the photosystem function in phytoplankton similar to other acetanilides, causing severe damage or cell death.

Keywords: *Prorocentrum minimum*, pretilachlor (PRE), photosystem, genes response, reactive oxygen species (ROS)

서 론

아세트아닐라이드계 제초제는 한해살이 식물과 활엽 식물의 초기 성장을 방해하는 제초제로, 전 세계적으로 널리

사용되고 있다(Martin and Worthing 1974; Cummins *et al.* 2013). 이들은 주로 논 제초제로 사용되며, 콩, 오이, 땅콩, 옥수수 등 밭 작물의 광엽 잡초 제초에 쓰인다(EFSA 2008; Jursik *et al.* 2011). 아세트아닐라이드계 제초제는 K3 그룹

에 속하며, 세포 내 매우 긴 사슬 지방산(very long chain fatty acid, VLCFA) 합성, 지베렐린 전구체와 플라보노이드의 대사를 저해하는 것으로 알려져 있다(Wilkinson 1981, 1982; Götz and Böger 2004). 게다가, 이들은 식물의 광합성과 RNA 합성에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Ashton *et al.* 1977; Sloan and Camper 1986). 그러나, 대상 제초제의 작용 메커니즘 및 농작물과 잡초에 미치는 생리적 영향은 잘 파악되었음에도 불구하고, 비표적 생물인 수생식물 및 미세조류에 대한 연구는 아직 부족하다.

대표적인 아세트아닐라이드계 제초제는 alachlor, acetochlor, metolachlor, butachlor, pretilachlor (PRE) 등이 있으며, 환경에서 잘 분해되지 않고 광분해 시 그 독성이 유사하거나 더 증가하는 것으로 보고되었다(Souissi *et al.* 2013). 그중, alachlor와 heptachlor는 세계자연기금(World Wide Fund for Nature, WWF)과 미국 환경 보호국(The United States Environmental Protection Agency, USEPA)에서 내분비계 장애물질로 규정하고 있다. 이에 따라 alachlor는 정책적으로 음용수 잔류 수치가 $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 이하가 되도록 모니터링한다(EU 2007). 현장 조사에 따르면 아세트아닐라이드계 제초제는 농업 유출수로 하천과 강을 통해 바다로 유입되고 있다(Wauchope 1978; Skaggs *et al.* 1980; Almeida *et al.* 2007; Tyohemba *et al.* 2020). 특히, alachlor는 스페인만을 비롯한 해안가의 퇴적물에서 검출되기도 하였다(Rial *et al.* 2017). 이들 아세트아닐라이드계 제초제가 유해물질로 지정되어 수출입이 제한되면서, 최근 PRE 등 대체 제초제의 사용이 증가하고 있다.

PRE는 중등도(moderate toxicity)의 독성을 갖지만, 수생 생물에게는 독성이 강해서 장기적으로 수생태계에 악영향을 미칠 수 있다(ChemBlink CAS# 51218-49-6). 따라서 한국 정부는 농산물에 대한 PRE의 잔류허용기준을 $0.05 \sim 1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ 으로 정하고 있다(MFDS 2018). 국내에서 조사한 바에 따르면, 토양에 살포된 PRE의 최소 83.9%는 잔류하고 최대 8.2%는 용출되었고(Lee *et al.* 1998), 사질식 양토(sandy clay soil)의 내부 10 cm까지 침투하는 것으로 보고되었다(Moon *et al.* 1987). 또한, 토양에 잔류하는 PRE는 자연적으로 제거되지 않으며(Wei *et al.* 2011), 비 흡수율은 상대적으로 낮기 때문에 농업 폐수에 의해 수계로 노출될 가능성이 높다(Lee *et al.* 1998). 현재까지 연구는 주로 농지에 잔류하는 PRE 검출과 미생물 분해에 의한 잔류 물질 전환에 집중되었으며(Posecion *et al.* 2006; Tsuda *et al.* 2009;

Van Toan *et al.* 2013; Nykiel-Szymańska *et al.* 2020), 수계로 유출되어 담수 및 해양 생물에 미치는 영향은 거의 파악되지 않았다. 특히, 광합성 미세조류를 비롯한 비표적 생물에 대한 환경적 위험 및 유전 독성이 연구된 바는 거의 없다(Kaushik *et al.* 2010). 따라서, 수생태계의 비표적 생물에 대한 PRE의 독성과 그 메커니즘에 대한 이해가 필요하다.

광합성 와편모조류 *Prorocentrum minimum*은 해양의 중요한 1차 생산자이며 전 세계 수역에 분포한다(Heil *et al.* 2005). 이 종은 실험실에서 배양이 용이하고 오염 물질과 환경 변화에 민감하기 때문에, 다양한 물질을 대상으로 독성 평가에 사용되어왔다(Okumura *et al.* 2003; de Kuhn *et al.* 2006; Guo *et al.* 2012; Ebenezer and Ki 2013a; Wang *et al.* 2019). 실제, 한국에서 분리된 *P. minimum* 배양주 D-127은 배양 조건, 중금속, 환경호르몬, 유기오염물 등에 민감하게 반응하는 것으로 파악되었다. *P. minimum* D-127은 영양염(Abassi and Ki 2021), 중금속 CuSO_4 (Guo and Ki 2013), 살조제 NaOCl (Ebenezer and Ki 2013a), 살충제 endosulfan (Ebenezer and Ki 2012), 제초제 alachlor (Kim *et al.* 2020), metazachlor (Kim *et al.* 2021), metolachlor (Ebenezer and Ki 2013b), 내분비 교란 물질 polychlorinated biphenyls (Ponmani *et al.* 2015), bisphenol A (Ebenezer and Ki 2016)에 민감하게 반응하였다. 이러한 결과는 *P. minimum*이 화학 물질 및 물리적 스트레스에 대한 독성 영향을 평가하기에 적합함을 보여준다.

본 연구는 아세트아닐라이드계 제초제 PRE가 해양 와편모조류 *P. minimum*에 미치는 독성을 평가하여, 해양 생태계에 미칠 수 있는 영향을 파악하고자 하였다. 세포의 성장 변화를 파악하고, 이를 바탕으로 반수영향농도(50% effective concentration, EC_{50})를 산출하였다. 또한 광합성과 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 축적 변화를 분석하여 PRE가 해양 광합성 생물에 작용하는 메커니즘을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 미세조류 배양 및 제초제 처리

해양 와편모조류 *Prorocentrum minimum* (D-127)은 한국해양미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center, Pukyong National University, Busan, Korea)에서 분

양받았다. 자연 해수를 Whatman GF/C로 여과 후 멸균 (121°C, 15분)하여 f/2 배지를 제조하고(Guillard 1975), 배양주는 20±0.5°C, 광량 60 μmol photons m⁻² s⁻¹, 명암 주기 12L:12D 조건에서 배양하였다. PRE가 *P. minimum*에 미치는 독성 영향을 파악하기 위해, 지수기(12일차)의 세포에 다양한 농도의 PRE를 처리하였다. 시험에 사용된 PRE (C₁₇H₂₆ClNO₂, Cas No. 51218-49-6)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)를 이용하여 표준 용액을 제작하고, 최종 농도가 0.0(대조군), 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 mg L⁻¹가 되도록 농도구배를 두었다. 이때 모든 실험군에 제공된 DMSO의 최종 농도는 0.1% 이하가 되도록 조성하였다. 유전자 발현 실험의 경우, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 mg L⁻¹의 PRE를 처리하였다. 모든 실험은 3회 반복 실험군으로 진행되었다.

2. 세포 계수 및 색소 분석

세포 성장에 미치는 영향을 파악하기 위해, 지수기(12일차)의 배양주에 서로 다른 농도의 PRE를 처리하고 시간경과(0, 24, 48, 72시간)에 따라 시료를 확보하였다. 세포 계수는 플랑크톤 계수기(HMA-S6117; Matsunami Glass, Osaka, Japan)에 0.2~1.0 mL의 시료를 분주하여(세포 밀도에 근거), 광학현미경 하에서 개체 수를 계수하였다.

미세조류의 색소 chlorophyll *a* (Chl *a*)와 carotenoids (CARs)는 분광광도계 DU730 Life Science UV/Vis spectrophotometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. *P. minimum*에 서로 다른 농도의 PRE를 처리하고 72시간 뒤에 20mL의 샘플을 Whatman GF/C 필터지에 여과하였다. 여과된 샘플은 90% 아세톤을 용매로 암실(4°C)에서 24시간 동안 정치 후, 원심분리하여 정제하였다. 90% 아세톤을 Blank로 설정하고 2mL의 샘플을 분광광도계로 분석 후, Parsons *et al.* (1984)에 따라 색소 농도를 계산하였다. 세포 계수와 색소 분석 모두 3회 반복으로 진행하였다.

3. 광합성 지표 분석

PRE가 *P. minimum*의 광계에 미치는 영향을 파악하기 위해 Handy Plant Efficiency Analyser fluorometer (Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK)를 사용하였다. 샘플 2 mL를 각 유리병에 분주한 뒤, 20°C에서 20분간 암실에 방치

하였다. PRE 농도 0.0, 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 mg L⁻¹으로 처리한 샘플을 24시간마다 형광값을 측정하였다. 각 시료의 최소 형광값(Minimum Fluorescence, *F*₀)과 최대 형광값(Maximum Fluorescence, *F*_m)을 분석하였고, 이를 통해 광계 II의 광합성 효율 지표 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ 와 식물의 활성 지표인 PI_{ABS} (Performance index on absorption basis)를 결정하였다(Strasser *et al.* 2000; Oukarroum *et al.* 2007).

4. RNA 추출, cDNA 합성 및 qRT-PCR 분석

PRE가 광합성 단백질 및 항산화 단백질을 암호화하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 파악하기 위해 실시간 정량적 중합효소연쇄반응(Quantitative real time-PCR, qRT-PCR)을 실시하였다. 선행연구에서 발굴한 *P. minimum*의 광합성 관련 유전자(*PmpsbA*, *PmpsaA*, *PmatpB*, *PmrbcL*)와 항산화 유전자(*PmGST*, *PmKatG*)를 선정하였고, 각 유전자에 특이적인 프라이머(*PmpsbA*-F, 5'-TGGATGGGAAGAGAGTGGGAG-3'; *PmpsbA*-R, 5'-TGCTGATGCTGCTACTATAGGTGC-3'; *PmatpB*-F, 5'-CAGCAGACGACCTAACGGATC-3'; *PmatpB*-R, 5'-CCTTTGCTTGCCAGGTTCCCTG-3'; *PmpsaA*-F, 5'-CTTAGGAGCACACGCATTTGGC-3'; *PmpsaA*-R, 5'-TGGCTTCATTGCTACTGCATTG-3'; *PmrbcL*-F, 5'-AGTTGTGGAAGGCAGGCACCTACG-3'; *PmrbcL*-R, 5'-GCGTCTTCGCGTACTCGACGAC-3'; *PmKatG*-F1, 5'-ATGAGGAGTGGGAGCAAGTCGC-3'; *PmKatG*-R1, 5'-TGTTTCGCTAACGCCAGGTACG-3'; *PmGST*-F1, 5'-TCCACCAATGAGCACCACCGA G-3'; *PmGST*-R1, 5'-AATGCGAGTCCGTTGACGACAC-3'; *PmTUA*-F, 5'-GCGTGCTGCATGATGTATCGTG-3'; *PmTUA*-R, 5'-ATCCGGTAGGGCACCAATCAAC-3')를 이용하여 상대적 유전자 발현량을 분석하였다(Guo and Ki 2012, 2013; Guo *et al.* 2014, 2017).

PRE를 24 및 72시간 처리 후, 200 mL의 *P. minimum*을 수확하고 상층액을 제거하였다. 각 시료에 1 mL의 TRIzol 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 0.1 mm zirconium bead를 첨가하였다. 시료는 즉시 액체 질소로 냉각하여 RNA 추출 전까지 -80°C에 보관하였다. Mini-Bead beater (BioSpec Inc., Bartlesville, OK, USA)로 세포를 파쇄(3000 rpm, 1분)하였다. RNA는 TRIzol 매뉴얼에 따라 추출하였

으며, 추출된 RNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)로 정제하였다. 정제된 RNA는 TOPscript™ cDNA Synthesis Kit (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다.

각 유전자의 상대적 발현을 분석은 CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 수행하였다. qRT-PCR 반응액은 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX SYBR Green Kit (Enzynomics) 10 µL, 희석된 cDNA 2 µL, 프라이머 각각 0.5 µL를 포함하여 총량 20 µL가 되도록 멸균 증류수를 첨가하였다. qRT-PCR 조건은 50°C에서 5분, 95°C에서 10분 동안 열을 가한 후, 95°C 10초, 60°C 15초, 72°C 15초 동안 40회 반복하여 반응시켰다. 증폭 특이성 확인을 위해, 샘플을 65°C에서 95°C로 점진적으로 가열하여 각 유전자의 용융곡선 (Melt curve)을 확인하였다. Cycle threshold (Ct) 값은 BioRad CFX 소프트웨어에서 얻었고, 각 유전자의 상대적 발현 값은 *Alpha tubulin* (*TUA*) 유전자를 이용하여 표준화하였다 (Pfaffl 2001; Guo and Ki 2012). 모든 반응은 3회 반복하였다.

5. 활성산소종 (ROS) 측정

세포 내 축적된 ROS를 분석하기 위해 Dihydroxyrhodamine-123 (DHR-123, Sigma-Aldrich)을 사용하였다. DHR-123는 전하를 띠지 않는 비형광 염료지만, ROS에 의해 산화될 때 초록색으로 발광한다 (Qin et al. 2008). *P. minimum* 배양액에 0.5 및 1.0 mg L⁻¹의 PRE를 24시간 동안 처리 후, 각 시료를 50 mL씩 수확하였다. f/2 배지를 제거해 농축한 시료에 DHR-123의 최종 농도가 10 µM이 되도록 처리 후, 1시간 동안 암실 (20°C)에 정치하였다. 그 후, 각 시료를 신선한 f/2 배지로 2회 세척하고, 형광 현미경으로 관찰하였다. 촬영한 형광 이미지를 기반으로 ImageJ 소프트웨어 (NIH, Bethesda, MD, USA)에서 세포당 ROS 수준을 분석하였다.

6. 데이터 통계 분석

모든 실험 결과 수치는 3회 반복 실험의 평균값으로 표시하였다. 실험의 대조군 (0.0 mg L⁻¹)과 실험군 간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용한 Tukey's HSD를 사용하여 유의성을 분석하였다. 통계 프로그램은 SPSS software (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였으며, *p* < 0.05는 유의한 결과로 규정하였다.

결과 및 고찰

1. 세포 성장 및 색소에 미치는 생리적 영향

PRE에 노출된 *P. minimum*의 개체 밀도와 색소를 관찰하였다 (Fig. 1). 대조군 (0.0 mg L⁻¹)은 72시간 배양 과정에서 개체 밀도가 정상적으로 증가하였다. 0.01 mg L⁻¹ 처리군은 노출 24시간 후 세포수가 감소하고 48시간에서 세포 성장을 회복하였다. 0.1~50.0 mg L⁻¹ 처리군은 노출 농도 및 시간 의존적으로 세포 수가 감소하는 경향을 보였다. 72시간의 PRE 노출 후, *P. minimum*의 색소 Chl *a*와 CARs는 농도 의존적으로 감소했으며 대조군 대비 각각 최대 66.6% (50.0 mg L⁻¹)와 39.4% (50.0 mg L⁻¹) 감소하였다.

세포 밀도를 기반으로 계산된 *P. minimum*에 대한 PRE의 EC₅₀ 값은 5.302 mg L⁻¹로 계산되었다 (Table 1). EC₅₀ 비교 결과, 해양 외편모조류 *P. minimum*의 EC₅₀는 담수 식물 *Lemna minor* (0.004~0.009 mg L⁻¹), 담수 녹조류 *Desmodes-*

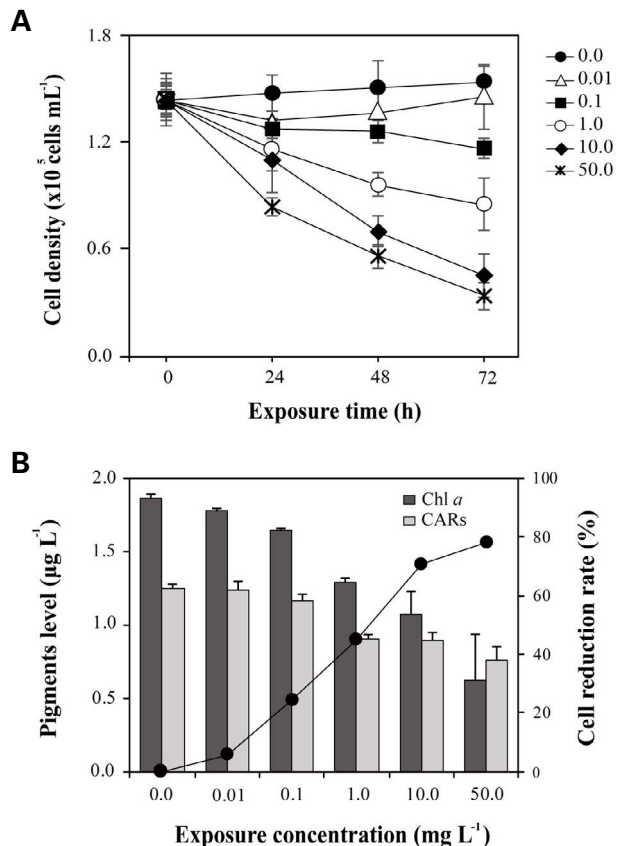


Fig. 1. Variation in cell density of *Prorocentrum minimum* at different time intervals after pretilachlor (PRE) treatment (A), and changes in pigments level after 72 h of PRE treatment (B).

Table 1. The effective concentration values of photosynthetic organisms after exposed to pretilachlor

Level	Species	mg L ⁻¹	Days	References
EC ₅₀	<i>Prorocentrum minimum</i>	5	3	This study
	<i>Achnanthydium minutissimum</i>	5	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2	4	Ma <i>et al.</i> (2002)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	20	4	Ma <i>et al.</i> (2002)
		3	3	Kasai and Hatakeyama (1993)
		0.70	3	Kasai and Hatakeyama (1993)
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	0.062	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)
	<i>Lemna minor</i> (Frond area)	0.004	7	Ueda <i>et al.</i> (2021)
	<i>Lemna minor</i> (Frond number)	0.009	7	Ueda <i>et al.</i> (2021)
	<i>Navicula pelliculosa</i>	1	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)
	<i>Nitzschia palea</i>	15	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	0.10	4	Ma <i>et al.</i> (2006)
		0.002	3	Kasai and Hatakeyama (1993)
		0.001	3	Kasai and Hatakeyama (1993)
		0.002	3	Nagai <i>et al.</i> (2011)
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	9	4	Ma <i>et al.</i> (2002)
	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	0.004	1	Junghans <i>et al.</i> (2003)
<i>Pseudanabaena galeata</i>	4	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)	
EC ₁₀	<i>Lemna minor</i>	0.001	7	Ueda <i>et al.</i> (2021)
	<i>Lemna minor</i>	0.001	7	Ueda <i>et al.</i> (2021)
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	0.005	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)
	<i>Pseudanabaena galeata</i>	4	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)
	<i>Achnanthydium minutissimum</i>	0.12	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)
	<i>Nitzschia palea</i>	1.90	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)
	<i>Navicula pelliculosa</i>	0.02	5	Nagai <i>et al.</i> (2016)
EC ₀₅	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	0.001	1	Junghans <i>et al.</i> (2003)

mus subspicatus (0.062 mg L⁻¹), *Scenedesmus vacuolatus* (0.004 mg L⁻¹), *Selenastrum subcapitata* (0.001~0.002 mg L⁻¹)보다 높은 반면, 담수 규조류 *Achnanthydium minutissimum* (5 mg L⁻¹)와 유사하고, 규조류 *Nitzschia palea* (15 mg L⁻¹)보다 낮았다. *Chlorella sp.*를 제외한 담수 녹조류가 PRE에 더 민감하고, 남조류, 규조류, 와편모조류에 덜 민감한 경향을 보였다.

EC₅₀는 분석 지표 (세포 성장률, 색소, 엽상체 수 또는 면적), 배양 시간 (3~7일), 성장 조건 (온도, 빛, 염분, 영양분)에 따라 달리 계산되며, 같은 종이라도 배양주에 따라 EC₅₀가 다르다 (Kasai *et al.* 1993). 특히, 해수의 특성은 제초제 성분 및 독성에 영향을 미칠 수 있다 (Sverdrup *et al.* 2001). 또한, 선행연구에서 alachlor와 metazachlor에 대한 *P. minimum*의 EC₅₀는 각각 0.3 mg L⁻¹와 0.6 mg L⁻¹로 PRE보다 낮았으나, 아세트아닐라이드계 제초제가 공통적으로 *P. minimum*의 성장을 저해하고 색소 감소를 유도한다 (Kim *et*

al. 2020, 2021). 본 연구 결과는 담수 녹조류, 규조류, 남조류와 해수 와편모조류를 포함한 광영양생물에게 독성 영향이 있고, 다양한 해양 생물에게 유해한 영향을 미칠 수 있음을 시사한다 (Mohr *et al.* 2007, 2008).

2. 광합성 지표 변화

아세트아닐라이드계 제초제는 식물의 틸라코이드막을 포함한 세포막 지방산 합성 억제 및 광합성 저해 등 광계에 다양한 영향을 미치는 것으로 보고되었다 (Trenkamp *et al.* 2004; Kim *et al.* 2020, 2021). 마찬가지로, PRE는 *P. minimum*의 광계 II 최대 양자수득률 (F_v/F_m), 최대 형광값 (F_m), 광계 II 광화학 성능지수 (PI_{ABS})를 유의하게 감소시켰다 (Fig. 2). F_v/F_m 과 F_m 은 0.01~1.0 mg L⁻¹에서 대조군과 유사했으나, 10.0~50.0 mg L⁻¹에서 유의하게 감소하였다

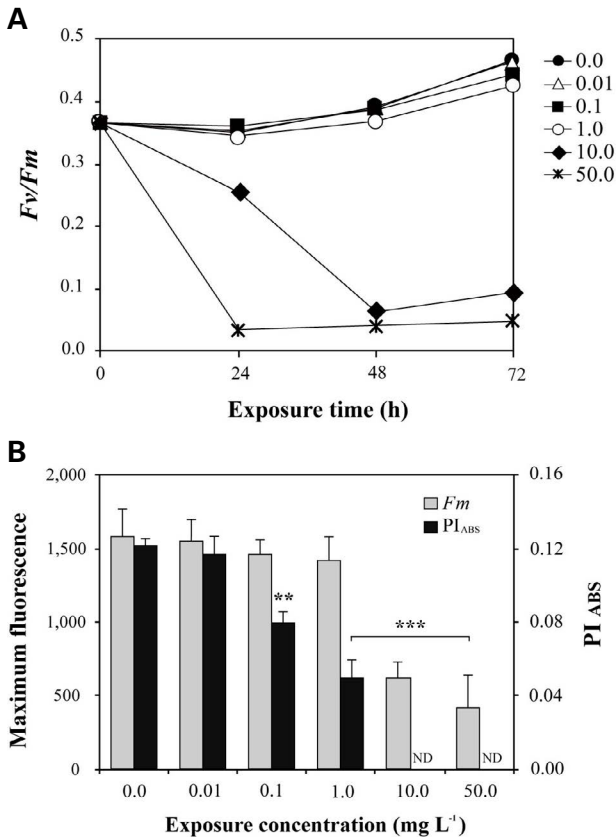


Fig. 2. Effect of pretilachlor (PRE) on the photosystem of *Prorocentrum minimum*. Variations in photosynthesis efficiency (F_v/F_m) at different time intervals (A), and maximum fluorescence and PI_{ABS} after 72 h of exposure (B). Significant differences between the control and treated samples, as determined by one-way ANOVA, are highlighted ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

($p < 0.001$). 특히, PI_{ABS} 의 경우 0.1 $mg L^{-1}$ 부터 유의하게 감소하고 ($p < 0.01$), 10.0~50.0 $mg L^{-1}$ 에서 검출되지 않았다 ($p < 0.001$). 일반적으로 F_v/F_m 은 광반응에서의 형광 수율을 의미하며 (Strasser *et al.* 2000), PI_{ABS} 는 에너지 전환 효율에 근거한 식물의 활성을 판단 지표로 사용되고 있다 (Oukarroum *et al.* 2007). 이러한 결과는 고농도 (10.0~50.0 $mg L^{-1}$)의 PRE 노출이 *P. minimum*의 광계 II 양자수득과 에너지 전환을 저해하고, 저농도 (0.1 $mg L^{-1}$)에서도 광계 II의 활성에 영향을 미친다는 것을 보여준다.

아세트아닐라이드계 제초제는 고등 식물의 광합성에 영향을 미치는 것으로 알려졌으며 (Ashton *et al.* 1977; Sloan and Camper 1986), 이는 제초제가 식물플랑크톤과 같은 비표적 광영양생물의 광합성을 저해할 가능성을 제시한다. 실제로, 선행연구에서 metazachlor에 노출된 *P. minimum*은

다양한 광합성 지표가 감소하였고, 주사전자현미경 관찰을 통해 세포 내 엽록체의 비분리 및 틸라코이드 막 와해가 관찰되었다 (Kim *et al.* 2021). 아세트아닐라이드계 제초제가 세포막의 구성 요소인 VLCFA의 합성을 억제해 틸라코이드 막을 붕괴시킬 가능성이 있으며 (Wilkinson 1982; Götz and Böger 2004), 결과적으로 엽록체와 틸라코이드 구조의 기형은 세포의 광합성 저해로 이어진다 (Campbell *et al.* 2006). 따라서, 본 연구결과는 PRE 또한 광영양생물의 광합성 기관의 기형을 유도하고, 결과적으로 광합성을 감소시킴을 제시한다.

3. 상대적 유전자 발현 변화

선행연구에서 아세트아닐라이드계 제초제가 광영양생물에 미치는 생리적 영향에 대해 보고했으나 (Ashton *et al.* 1977; Wilkinson 1982; Sloan and Camper 1986; Götz and Böger 2004; Kim *et al.* 2020, 2021), PRE 노출에 의한 분자생물학적 영향에 대한 연구는 아직 수행되지 않았다. 분자생물학적 영향을 파악하기 위해, *P. minimum*에 서로 다른 농도 (0.0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 $mg L^{-1}$)의 PRE를 24시간 및 72시간 처리 후, 광합성 관련 유전자 *PmpsbA*, *PmpsaA*, *PmatpB*, *PmrbcL*과 항산화 단백질 유전자 *PmKatG*, *PmGST*의 상대적 발현율을 분석하였다 (Fig. 3).

본 연구에 사용한 4개의 광합성 관련 유전자는 각각 광계 II (*PmpsbA*), 광계 I (*PmpsaA*), ATP 합성 효소 (*PmatpB*), 루비스코 (*PmrbcL*) 단백질의 소단위체를 암호화하는 유전자이며, 오염 물질을 포함한 환경 스트레스에 대한 바이오마커로 알려져 있다 (Shapira *et al.* 1997; Levitan *et al.* 2010). 특히, *psbA*는 광계 II의 D1 단백질을 암호화하는데, 스트레스에 의해 D1 단백질이 손상되었을 때 교체를 위해 *psbA* 발현이 조절된다 (Qian *et al.* 2011; Sakurai *et al.* 2012; Guo *et al.* 2017). PRE 노출 결과, *P. minimum*의 *PmrbcL*의 유전자 발현에는 유의한 변화가 없었으나, 24시간 노출 시 0.01~0.5 $mg L^{-1}$ 처리군에서 감소했다 ($p < 0.01$). 반면 *PmpsbA*, *PmpsaA*, *PmatpB*는 24시간의 1.0 $mg L^{-1}$ ($p < 0.001$), 72시간의 0.1 $mg L^{-1}$ ($p < 0.001$), 0.5 $mg L^{-1}$ ($p < 0.05$) 처리군에서 발현율이 유의하게 증가했다. 이는 PRE 노출 (1.0 $mg L^{-1}$) 24시간 후 틸라코이드 막의 광합성 단백질에 영향을 미치지만, 루비스코가 관여하는 탄소 고정에는 영향이 없음을 제시한다. 유사한 사례로 광합성을 억제하는 제초제 atrazine은 고등 식물 *Arabidopsis*의 *psbA* 발

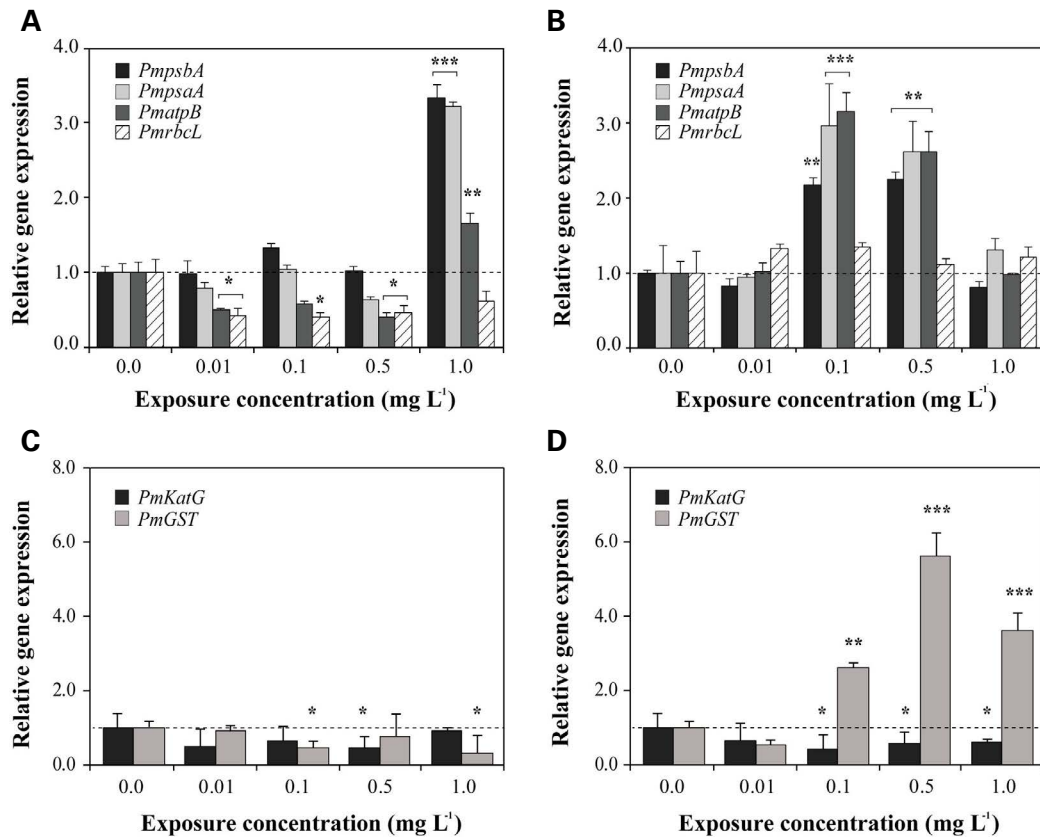


Fig. 3. Effect of pretilachlor (PRE) on photosynthesis-related gene expression after 24 h (A) and 72 h (B) of treatment, and antioxidant gene expression after 24 h (C) and 72 h (D) of treatment. Significant differences between the control and treated samples, as determined by one-way ANOVA, are highlighted * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

현과 D1 단백질을 증가시켰다(Sulmon *et al.* 2004). 또한, 선행연구에서 살조 효과가 높은 염소와 CuSO₄, alachlor, metazachlor에 노출된 *P. minimum*의 *psbA* 발현율이 유의하게 증가하였다(Guo *et al.* 2017; Kim *et al.* 2020, 2021). 게다가, 광합성 지표 F_v/F_m 은 10.0 mg L⁻¹부터 감소한 반면, *Pmpsba*, *PmpsA*의 상대적 유전자 발현율은 1.0 mg L⁻¹부터 발현율이 3배 이상 증가하였다($p < 0.001$). 이는 PRE가 광영양생물의 광합성 단백질을 손상시키며, 노출 24시간부터 영향을 미친다는 것을 보여준다.

대부분의 생물은 다양한 항산화 효소로 다양한 형태의 ROS로부터 세포를 보호한다(Urso and Clarkson 2003). 그 중 glutathione S-transferase (GST)와 catalase-peroxidase (KatG)는 해양 외편모조류 *P. minimum*에서 주로 연구된 대표적인 항산화 단백질이다(Guo and Ki 2013; Guo *et al.* 2014). 그리고 GST는 외래 물질과 glutathione (GSH)의 결합을 촉매하여 해독하는 활성을 가졌다(Hayes and Pulford

1995). GST와 KatG는 ROS, 오염 물질 등 다양한 스트레스에 의해 유도될 수 있기 때문에, 이를 암호화하는 유전자는 산화 및 독성 물질에 대한 바이오 마커로 사용되고 있다(Guo *et al.* 2014; Kim *et al.* 2021). 실험 결과, PRE 노출에서 *PmKatG*의 발현율에 변화가 없었으나, *PmGST*의 발현율은 노출 72시간 후 0.1~1.0 mg L⁻¹ 처리군에서 최대 6배 이상 증가했다($p < 0.001$). 이는 *P. minimum*의 세포 내 항산화 단백질 GST 합성이 PRE에 의해 증가했으며, 오염 물질의 무독화 과정에서 유도되었을 가능성이 더 높음을 보여준다. GST의 과발현은 제초제에 대한 내성을 향상시키는 것으로 알려졌으며(Milligan *et al.* 2001; Benekos *et al.* 2010), 선행연구에서 아세트아닐라이드계 제초제 acetochlor와 metolachlor는 *Arabidopsis*의 GST에 의해 GSH 결합되어 액포에 격리되는 것으로 보고하였다(Mezzari *et al.* 2005). 이러한 메커니즘은 alachlor, metazachlor에 노출된 *P. minimum*에서도 동일하게 확인되었고(Kim *et al.* 2020, 2021),

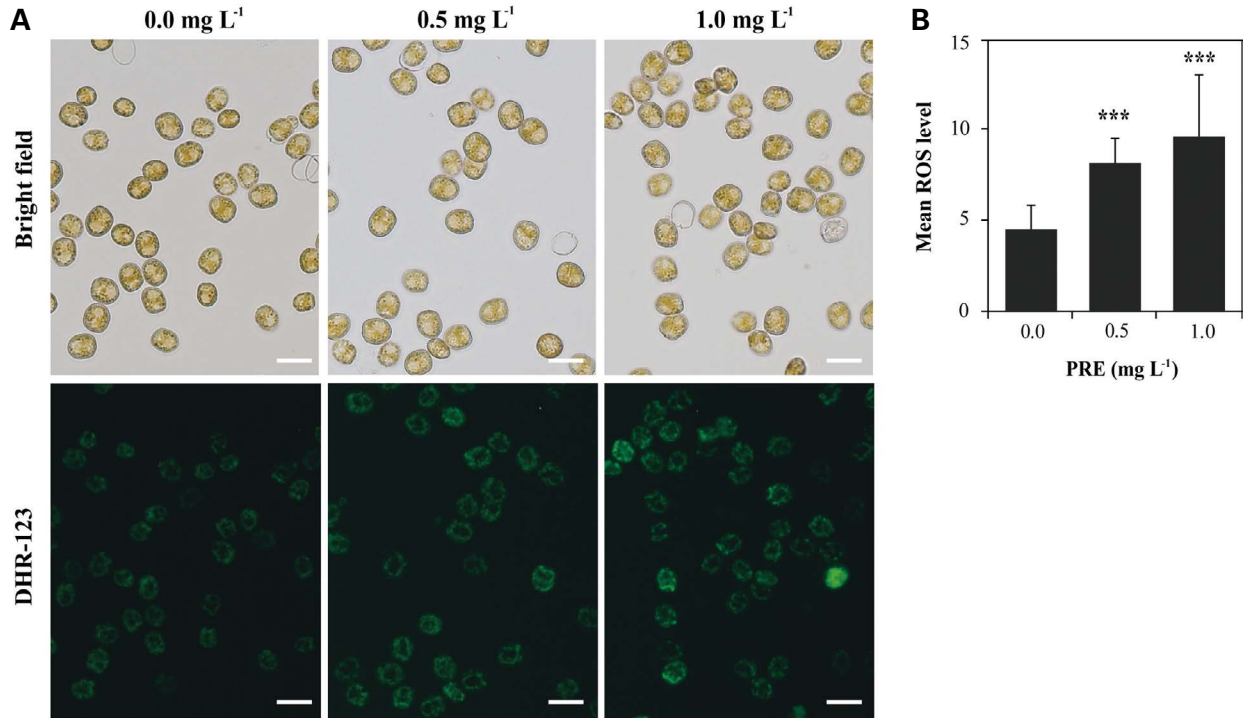


Fig. 4. Bright-field image and dihydrorhodamine-123 (DHR-123) staining image of *Prorocentrum minimum* after 24 h of pretilachlor (PRE) treatment (A) and mean reactive oxygen species (ROS) levels (B). Scale bars represent 20 μm and a significant difference between the control and treated samples, as determined by one-way ANOVA, is highlighted *** $p < 0.001$.

PRE 또한 GST에 의해 해독되지만 유전자의 발현 시기와 농도는 제초제에 따라 차이를 제시한다.

4. 활성산소 Pretilachlor에 의한 ROS 축적

*PmGST*와 *PmKatG* 유전자 발현과 관련하여, PRE가 *P. minimum*의 세포 내 ROS 축적을 유도하는지 DHR-123 형광 이미지를 통해 확인하였다(Fig. 4). 0.5 및 1.0 mg L⁻¹의 PRE를 24시간 노출한 결과, 1.0 mg L⁻¹를 처리한 *P. minimum*의 액포 크기가 거대해졌으며, 이는 아세트아닐라이드계 제초제에 노출된 *Arabidopsis*에서도 동일한 경향이 확인되었다(Mezzari et al. 2005). 또한, *P. minimum*에 축적된 ROS는 대조군에 비해 2배 이상 증가하였다($p < 0.001$). 선행연구도 마찬가지로, alachlor와 metazachlor는 세포 내 ROS 생성을 유도하였으며(Kim et al. 2020, 2021), 고농도의 metolachlor 노출은 녹조류 *Pseudokirchneriella subcapitata*의 ROS, 지질 과산화 및 세포막 손상을 초래하였다(Machado and Soares 2021). 따라서, *P. minimum*의 ROS 축적은 PRE에 의한 전자 전달 메커니즘이 붕괴된 광합성 저

해에 의한 스트레스 반응으로 추정된다. 본 연구 결과는, 아세트아닐라이드계 제초제가 GST에 의해 해독 메커니즘을 거치지만, 고농도 또는 장기간 노출은 광합성 저해와 ROS 축적 및 세포 사멸까지 유발한다는 것을 시사한다.

적 요

Pretilachlor (PRE)는 전 세계적으로 사용되는 아세트아닐라이드계 제초제이며 수생 광영양생물에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 본 연구에서 해양 외편모조류 *P. minimum*를 대상으로 PRE의 생리적, 분자적 독성 영향을 평가하였다. 그 결과, PRE는 *P. minimum*의 성장률, 색소, 광합성 지표를 유의하게 감소시켰다. 또한, 광합성 관련 유전자 *PmpsA*, *PmpsB* 및 항산화 단백질 *PmGST*의 상대적 유전자 발현율과 세포 내 ROS 증가가 유의하였다. 이는 PRE가 *P. minimum*의 광합성 효율 저하 및 광계 손상을 야기하며, GST가 세포 내 산화 스트레스 및 PRE의 무독화에 관여함을 보여준다. 본 연구 결과는 PRE를 비롯한 아세

트아닐라이드계 제초제가 해양 와편모조류의 세포 독성을 야기하며, 광합성 저해가 스트레스의 주요 원인임을 제시한다. 다른 아세트아닐라이드계 제초제가 비표적 광영양 생물에게 미치는 독성 영향은 아직 연구가 부족하므로, 향후 연구에서 다양한 생물종을 대상으로 추가 연구가 필요하다.

사 사

이 논문은 2020년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2020R1A2C2013373).

REFERENCES

- Abassi S and JS Ki. 2021. Increased nitrate concentration differentially affects cell growth and expression of nitrate transporter and other nitrogen-related genes in the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Chemosphere* 288:132526.
- Almeida C, P Serôdio, MH Florêncio and JMF Nogueira. 2007. New strategies to screen for endocrine-disrupting chemicals in the Portuguese marine environment utilizing large volume injection-capillary gas chromatography-mass spectrometry combined with retention time locking libraries (LVI-GC-MS-RTL). *Anal. Bioanal. Chem.* 387:2569-2583.
- Ashton FM, OT de Villiers, RK Glenn and WB Duke. 1977. Localization of metabolic sites of action of herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7:122-141.
- Benekos K, C Kissoudis, I Nianiou-Obeidat, N Labrou, P Madesis, M Kalamaki, A Makris and A Tsafaris. 2010. Overexpression of a specific soybean *GmGSTU4* isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants. *J. Biotechnol.* 150:195-201.
- Campbell SJ, LJ McKenzie and SP Kerville. 2006. Photosynthetic responses of seven tropical seagrasses to elevated seawater temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 330:455-468.
- Cummins I, DJ Wortley, F Sabbadin, Z He, CR Coxon, HE Straker, JD Sellars, K Knight, L Edwards, D Hughes, SS Kaundun, SJ Hutchings, PG Steel and R Edwards. 2013. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:5812-5817.
- De Kuhn RM, C Streb, R Breiter, P Richter, T Neeße and DP Häder. 2006. Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. *Water Res.* 40:2695-2703.
- Ebenezer V and JS Ki. 2013a. Physiological and biochemical responses of the marine dinoflagellate *Prorocentrum minimum* exposed to the oxidizing biocide chlorine. *Ecotox. Environ. Safe.* 92:129-134.
- Ebenezer V and JS Ki. 2013b. Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae), and *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae). *J. Microbiol.* 51:136-139.
- Ebenezer V and JS Ki. 2014. Quantification of toxic effects of the organochlorine insecticide endosulfan on marine green algae, diatom and dinoflagellate. *Indian J. Mar. Sci.* 43:393-399.
- Ebenezer V and JS Ki. 2016. Toxic effects of Aroclor 1016 and bisphenol A on marine green algae *Tetraselmis suecica*, diatom *Ditylum brightwellii* and dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Korean J. Microbiol.* 52:306-312.
- EFSA. 2008. Opinion on a request from EFSA related to the default Q10 value used to describe the temperature effect on transformation rates of pesticides in soil - Scientific: Opinion of the Panel on Plant Protection Products and their Residues. *EFSA J.* 622:1-32.
- EU. 2007. European Communities (Drinking Water) No. 2 Regulations. No. 278. European Union. pp. 22-23.
- Götz T and P Böger. 2004. The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides. *Z. Naturforsch. C* 59:549-553.
- Guillard RR. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp. 29-60. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer, Boston, MA.
- Guo R, V Ebenezer and JS Ki. 2012. Transcriptional responses of heat shock protein 70 (*Hsp70*) to thermal, bisphenol A, and copper stresses in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Chemosphere* 89:512-520.
- Guo R, V Ebenezer, H Wang and JS Ki. 2017. Chlorine affects photosystem II and modulates the transcriptional levels of photosynthesis-related genes in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J. Appl. Phycol.* 29:153-163.
- Guo R and JS Ki. 2012. Evaluation and validation of internal control genes for studying gene expression in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* using real-time PCR. *Eur. J. Protistol.* 48:199-206.
- Guo R and JS Ki. 2013. Characterization of a novel catalase-peroxidase (*KATG*) gene from the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J. Phycol.* 49:1011-1016.
- Guo R, V Ebenezer and JS Ki. 2014. *PmMGST3*, a novel microsomal glutathione S-transferase gene in the dinoflagellate

- Prorocentrum minimum*, is a potential biomarker of oxidative stress. *Gene* 546:378–385.
- Guo R, V Ebenezer, H Wang and JS Ki. 2017. Chlorine affects photosystem II and modulates the transcriptional levels of photosynthesis-related genes in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J. Appl. Phycol.* 29:153–163.
- Hayes JD and DJ Pulford. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of *GST* and the contribution of the Isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:445–520.
- Heil CA, PM Glibert and C Fan. 2005. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller: a review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance. *Harmful Algae* 4:449–470.
- Junghans M, T Backhaus, M Faust, M Scholze and LH Grimme. 2003. Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Manag. Sci.* 59:1101–1110.
- Jursík M, J Soukup, J Holec and J Andr. 2011. Herbicide mode of actions and symptoms of plant injury by herbicides: Inhibitors of very long chain fatty acid biosynthesis. *Listy Cukrov. Repar.* 127:15.
- Kasai F and S Hatakeyama. 1993. Herbicide susceptibility in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere* 27:899–904.
- Kasai F, N Takamura and S Hatakeyama. 1993. Effects of simetryne on growth of various freshwater algal taxa. *Environ. Pollut.* 79:77–83.
- Kaushik S. 2010. Effect of herbicides with different modes of action on physiological and cellular traits of *Anabaena fertilissima*. *Paddy Water Environ.* 8:277–282.
- Kim H, H Wang, S Abassi and JS Ki. 2020. The herbicide alachlor severely affects photosystem function and photosynthetic gene expression in the marine dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J. Environ. Sci. Health Part B* 55:620–629.
- Kim H, H Wang and JS Ki. 2021. Chloroacetanilides inhibit photosynthesis and disrupt the thylakoid membranes of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* as revealed with metazachlor treatment. *Ecotox. Environ. Safe.* 211:111928.
- Lee JK, KS Kyung, IS Jung, KC Ahn and JW Gwon. 1988. Elution of permeable insecticide carbofuran and herbicide pretilachlor in the soil column. *Korean J. Pest. Sci.* 2:59–67.
- Levitan O, SA Kranz, D Spungin, O Prášil, B Rost, I Berman-Frank. 2010. Combined effects of CO₂ and light on the N₂-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* IMS101: a mechanistic view. *Plant Physiol.* 154:346–356.
- Moon YH, SY Ma and HS Yang. 1987. Movement characteristics of herbicide pretilachlor in plants and soil. *Korean J. Pest. Sci.* 30:351–356.
- Ma J, L Xu, S Wang, R Zheng, S Jin, S Huang and Y Huang. 2002. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotox. Environ. Safe.* 51:128–132.
- Ma J, S Wang, P Wang, L Ma, X Chen and R Xu. 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotox. Environ. Safe.* 63:456–462.
- Machado MD and EV Soares. 2021. Exposure of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to environmentally relevant concentrations of the herbicide metolachlor: Impact on the redox homeostasis. *Ecotox. Environ. Safe.* 207:111264.
- Martin H and CR Worthing. 1974. *Pesticide Manual*, Fourth ed. British Crop Protection Council. Cambridge, UK.
- Mezzari MP, K Walters, M Jelínková, MC Shih, CL Just and JL Schnoor. 2005. Gene expression and microscopic analysis of *Arabidopsis* exposed to chloroacetanilide herbicides and explosive compounds. A phytoremediation approach. *Plant Physiol.* 138:858–869.
- Milligan AS, A Daly, MAJ Parry, PA Lazzeri and I Jepson. 2001. The expression of a maize glutathione S-transferase gene in transgenic wheat confers herbicide tolerance, both in planta and *in vitro*. *Mol. Breed.* 7:301–315.
- MFDS. 2018. Enforcement of PLS from 1 January 2019. Ministry of Food and Drug Safety. Cheongju, Korea. Retrieved from <https://www.mfds.go.kr/eng/index.do> on Dec. 27
- Mohr S, R Berghahn, M Feibicke, S Meinecke, T Ottenströer, I Schmiedling, R Schmiedling and R Schmidt. 2007. Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and stream mesocosms. *Aquat. Toxicol.* 82:73–84.
- Mohr S, M Feibicke, R Berghahn, R Schmiedliche and R Schmidt. 2008. Response of plankton communities in freshwater pond and stream mesocosms to the herbicide metazachlor. *Environ. Pollut.* 152:530–542.
- Nagai T, K Taya and I Yoda. 2016. Comparative toxicity of 20 herbicides to 5 periphytic algae and the relationship with mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 35:368–375.
- Nykiel-Szymańska J, P Bernat and M Slaba. 2020. Biotransformation and detoxification of chloroacetanilide herbicides by *Trichoderma* spp. with plant growth-promoting activities. *Pest. Biochem. Physiol.* 163:216–226.
- Okumura Y, J Iro Koayama and S Uno. 2003. The relationship between logPow and molecular weight of polycyclic aromatic hydrocarbons and EC₅₀ values. *La mer* 41:182–191.
- Oukarroum A, S El Madidi, G Schansker and RJ Strasser. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. *Environ. Exp. Bot.* 60:438–446.
- Parsons TR, Y Maita and CMI Lalli. 1984. *A Manual of Chemical*

- and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press. Oxford, UK.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:45–45.
- Ponmani T, R Guo and JS Ki. 2015. A novel cyclophilin gene from the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* and its possible role in the environmental stress response. *Chemosphere* 139:260–267.
- Posecion N, E Ostrea, D Bielawski, M Corrión, J Seagraves and Y Jin. 2006. Detection of exposure to environmental pesticides during pregnancy by the analysis of maternal hair using GC-MS. *Chromatographia* 64:681–687.
- Qian H, X Pan, S Shi, S Yu, H Jiang, Z Lin and Z Fu. 2011. Effect of nonylphenol on response of physiology and photosynthesis-related gene transcription of *Chlorella vulgaris*. *Environ. Monit. Assess.* 182:61–69.
- Qin Y, M Lu and X Gong. 2008. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biol. Int.* 32:224–228.
- Rial D, VM León and J Bellas. 2017. Integrative assessment of coastal marine pollution in the Bay of Santander and the Upper Galician Rias. *J. Sea Res.* 130:239–247.
- Sakurai I, D Stazic, M Eisenhut, E Vuorio, C Steglich, WR Hess and EM Aro. 2012. Positive regulation of *psbA* gene expression by cis-encoded antisense RNAs in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 160:1000–1010.
- Shapira M, A Lers, PB Heifetz, V Irihimovitz, CB Osmond, NV Gillham and JE Boynton. 1997. Differential regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* during photoacclimation: light stress transiently suppresses synthesis of the Rubisco LSU protein while enhancing synthesis of the PS II D1 protein. *Plant Mol. Biol.* 33:1001–1001.
- Skaggs RW, JW Gilliam, TJ Sheets and JS Barnes. 1980. Effect of Agricultural Land Development on Drainage Waters in the NC Tidewater Region. Water Resources Research Institute of the University of North Carolina. Raleigh, NC.
- Sloan ME and ND Camper. 1986. Effects of alachlor and metolachlor on cucumber seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 26:1–7.
- Souissi Y, S Bouchonnet, S Bourcier, KO Kusk, M Sablier and HR Andersen. 2013. Identification and ecotoxicity of degradation products of chloroacetamide herbicides from UV-treatment of water. *Sci. Total Environ.* 458:527–534.
- Strasser RJ, A Srivastava and M Tsimilli-Michael. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. pp. 445–483. In: *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Sulmon C, G Gouesbet, I Couée and A El Amrani. 2004. Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on *psbA* mRNA and D1 protein levels. *Plant Sci.* 167:913–923.
- Sverdrup LE, T Källqvist, AE Kelley, CS Fürst and SB Hagen. 2001. Comparative toxicity of acrylic acid to marine and freshwater microalgae and the significance for environmental effects assessments. *Chemosphere* 45:653–658.
- Trenkamp S, W Martin and K Tietjen. 2004. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty Acid Elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:11903–11908.
- Tsuda T, T Nakamura, A Inoue and K Tanaka. 2009. Pesticides in water, fish and shellfish from littoral area of Lake Biwa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82:716–721.
- Tyohemba RL, L Pillay and MS Humphries. 2020. Herbicide residues in sediments from Lake St Lucia (iSimangaliso World Heritage Site, South Africa) and its catchment areas: Occurrence and ecological risk assessment. *Environ. Pollut.* 267:115566.
- Ueda K and T Nagai. 2021. Relative sensitivity of duckweed *Lemna minor* and six algae to seven herbicides. *J. Pest. Sci.* 46:267–273.
- Urso ML and PM Clarkson. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189:41–54.
- Van Toan P, Z Sebesvari, M Bläsing, I Rosendahl and FG Renaud. 2013. Pesticide management and their residues in sediments and surface and drinking water in the Mekong Delta, Vietnam. *Sci. Total Environ.* 452:28–39.
- Wang H, S Abassi and JS Ki. 2019. Origin and roles of a novel copper-zinc superoxide dismutase (*CuZnSOD*) gene from the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Gene* 683:113–122.
- Wauchope RD. 1978. The pesticide content of surface water draining from agricultural fields - a review. *J. Environ. Qual.* 7:459–472.
- Wei J, Y Feng, X Sun, J Liu and L Zhu. 2011. Effectiveness and pathways of electrochemical degradation of pretilachlor herbicides. *J. Hazard. Mater.* 189:84–91.
- Wilkinson RE. 1981. Metolachlor [2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl) acetamide] inhibition of gibberellin precursor biosynthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 16:199–205.
- Wilkinson RE. 1982. Alachlor influence on sorghum growth and gibberellin precursor synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 17:177–184.