

Oxyfluorfen에 대한 耐性 및 感受性 水稻品種의 電氣泳動 表現型 差異

鞠龍仁* · 具滋玉* · 李度鎮* · 金永柱*

Difference in Electrophoretic Phenotypes of Rice Cultivars Selected to Oxyfluorfen

Kuk Y.I.*, J.O. Guh*, D.J. Lee* and Y.J. Kim*

ABSTRACT

The study was intended to know any relations between the rice tolerance to oxyfluorfen and varietal speciation in seed protein composition or any enzymatical alleles with or without chemical treatment. Rice varieties used were Chokoto, Aichiasahi, Agabyeo, IR 3941 and Tablei as the tolerant group, and Mushakdanti, Weld Pally, HP 1033, HP 857, and HP 907 as the susceptible, respectively. Electrophoretic methods used were SDS-PAGE for seed protein, 7% PAGE for isozymes (acid phosphatase and peroxidase from rice seedling) and changes in isoenzyme activity (malate dehydrogenase, peroxidase and esterase) as affected by oxyfluorfen treatment ($10^{-4}M$). was also studied.

The results are summarized as follows.

- Among 19 bands separated in seed proteins, two different rice groups selected in terms of tolerance were clustered in dissimilarity. This was based on 2 facts in that G band was not present in susceptible varieties and that less activity of H, N, O, P, Q, R and S band was shown.
- Among 4 bands separated in acid phosphatase, the presence of (band and lower activity of B band was specific for tolerant varieties. For 4 minor bands separated in peroxidase, the tolerant varieties had no activity in B band and higher activity in A, C, D bands.
- Time-course study of isozymes as affected by $10^{-4}M$ oxyfluorfen showed that Chokoto, the tolerant varieties, had little activity in A band and consistently higher activities in B and C bands for malate dehydrogenase. For 5 bands separated in peroxidase, B band was not found in Chokoto while A, C, D, and E bands were consistently present. Esterase was separated into about 4 bands in which Chokoto had maintained higher activities in A, C and D bands.

緒 言

모든 生物은 주어지는 環境에 適應하는 能力을 가지고 태어나며, 그 方式으로는 스스로 變해서 環境에 맞추는 遺傳子型的 分化現象 즉 生態的分化性(ecotyping)과 環境을 극복해서 形態的·生理的으로 特異하게 發育해 가는 表現型可變性(phenotyping)을 갖는 것으로 알려져 있으며²⁸⁾ 除草劑에의 抵抗

性出現도 이에 속한다고 한다. 즉 除草劑에 대한 反應은 種間이나 種內에서도 多様하게 나타나는데 이를 통한 種 特異性的 研究¹⁴⁾나 品種特異性研究¹⁸⁾가 갖는 意義는 크며, 이를 위한 方法 가운데 蛋白質이나 核酸의 化學的인 分類, 同位酵素의 pattern分析^{10, 20, 29, 31, 32)} 및 多種의 電氣泳動法^{3, 10, 26)}이 報告되고 있다. 最近의 發展結果로, 電氣泳動法을 통한 系統發生學的, 集團遺傳學的研究과 Genome 分析도 많은 植物種間의 有緣關係가 밝혀지고 있다^{12, 13, 26,}

* 全南大學校 農科大學 Coll. of Agriculture, Chonnam National Univ, Kwangju 500-757, Korea

30, 31). 이는 Tateoka²⁷⁾가 설명한 바, 酵素蛋白質이 遺傳子의 一次産物이기 때문에 이에 대한 差異解析이 酵素合成에 關與하는 遺傳子型을 決定하는데 가장 용이하고 또한 效果적이기 때문이다. 除草劑에 關聯한 研究로 淺野²⁾는 IEF 및 SDS-PAGE 法으로 蛋白質 및 peroxidase를 分離하여 藥劑(paraquat) 耐성에 따른 特異 Band와 活性도를 確認한바 있다. Cerdeira 등⁴⁾이나 Price 등²⁴⁾도 除草劑 反應差異가 있는 品種의 酵素 및 形態變異를 調査한 바 있다. 本 研究도 이와 같은 觀點에서, 既히 選拔된 oxyfluorfen에의 耐性 및 感受性品種을 供試하여 이들이 갖는 品種特異성을 蛋白質 및 일부 同位酵素的 電氣泳動 pattern 差異와 特定 Band有無로 確認해 볼 目的으로 遂行되었다.

材料 및 方法

1. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)法에 의한 種實蛋白質의 電氣泳動 樣相

供試品種은 既히 400餘 水稻品種 가운데 oxyfluorfen에 가장 耐性を 보였던 Chokoto, Aichiasahi, Agabyeo, IR 3941-6-1과 Tabali의 5品種과 가장 感受성이었던 Mushakdanti, Weld pally, HP 1033-1-1-1-1-1-1-B-1, HP 857-B-1-2-B-1-1 및 HP 907-B-2-2-1-1-1-1-B-1의 5品種이었다.

分析試料은 尤발로 곱게 마쇄한 후 供試品種의 種實 50mg에 1.5ml의 抽出緩衝液(0.0625 M tris-HCl pH 6.8, 5% 2-mercaptoethanol, 4% glycerol, 3% SDS)을 添加하고 40°C에서 1時間 동안 反應시킨 後에 95~100°C의 water bath에서 2分 동안 끓였다. 이를 4°C의 冷凍遠心分離機에서 10,000×g으로 5分間 遠心分離하고 이로부터 얻은 上등액을 電氣泳動의 試料로 使用하였다.

電氣泳動은 Laemmli의 SDS(sodium dodecyl sulfate)-PAGE法¹⁷⁾에 準하여 遂行하였으며, polyacrylamide gel은 1.25 M tris-HCl 緩衝液(pH 8.8) 12% resolving gel로 하였으며, 125×140×1.5mm規格의 vertical slab裝置에 gel을 形成시켰다.

試料을 100μl 取하여 loading하였으며, 여기에 使用한 電極緩衝液은 0.025 M tris, 0.192 M glycine 및 0.1% SDS pH 8.3이었으며, 電流은 20mA

에서 1時間, 40mA에서 4時間 電氣泳動시켰다.

發色은 Coomassie brilliant blue R 250 溶液을 使用하여 25°C에서 3時間 染色後 脫色은 1次로 95% ethanol과 5% acetic acid를 1:4(v/v)比率로 稀釋하여 1~2時間 脫色하고 2次로 5% acetic acid로 脫色하였다.¹⁾

分離된 band의 計量과 特異性分析을 위하여 densitometer(Joyee Loeb Chromoscan 3)로 scanning하고 각 peak의 크기를 算出하였으며, 이들 資料를 根據로 하여 similarity係數計算과 clustering을 함으로써²⁷⁾ 品種間의 類緣關係를 分析하였다.

2. 7% Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)法에 의한 同位酵素的 電氣泳動 樣相

供試品種도 選拔된 水稻品種 가운데 가장 代表的인 耐성과 感受性 品種으로 각각 Chokoto와 Weld pally를 選擇하였으며, 이들 種實을 3日間 浸種하고 催芽시킨 後에 plastic製 育苗箱子(57×28×2cm)内の vermiculite에 播種하고 硝子室內에서 4日間 育苗하였다. 4日令의 幼苗 地上部를 각각 0.2g씩 採取하여 分析試料로 하였다. 즉 0.2g의 試料에 1ml의 酵素抽出緩衝液(0.1M tris-HCl buffer, pH 7.5)을 添加하고 尤발로 곱게 마쇄한 後, 4°C의 高速冷凍遠心分離機에서 10,000×g로 20分間 遠心分離하였다. 上등액에 20% sucrose를 添加하여 同位酵素分離를 위한 試料로 하였다. 電氣泳動은 Davis方法⁸⁾을 應用한 連續分離方法에 準하였으며, 7% polyacrylamide gel은 3M tris-HCl緩衝液(pH 8.9)으로 resolving된 것으로서 125×140×1.5mm規格의 vertical slab裝置에서 gel을 形成시켰다.

同位酵素 抽出試料은 각각 100μl씩으로 loading하였으며, 여기에 使用한 電極緩衝液은 0.05 M tris와 0.38 M glycine(pH 8.3)을 1:9(v/v)의比率로 희석시킨 것이었다. 電流은 一次로 20 mV에서 1時間 泳動시킨 後 다시 40mV에서 3時間 電氣泳動시켰다.

各 酵素別의 發色過程은 다음과 같았다.

Esterase : Acetone 原液 1ml에 녹인 α-naphthyl acetate 30mg과 fast blue RR salt 50mg를 100 ml의 0.1 M tris-HCl 緩衝液(pH 7.2)에 녹인 發色液을 使用하였다. 즉 gel을 36°C에서 發色液에 約 20分間 浸漬하여 發色시켰다.²²⁾

Acid Phosphatase : α -naphthyl acid phosphate 70 mg 과 diazo blue B 70 mg를 35 ml의 sodium acetate 緩衝液 (pH 5.0)에 녹인 發色液에 30°C에서 約 2時間 浸漬하여 發色시켰다.²²⁾

Malate Dehydrogenase : DL-malic acid 140 mg, β -NAD 28 mg, NBT 14 mg, PMS 1.7 mg을 添加한 70 ml의 0.1 M tris-HCl 緩衝液 (pH 9.1)에 35°C에서 30分間 浸漬하여 發色시켰다.

Peroxidase : Benzidin 溶液 (benzidin 1g, acetate acid 9 ml, 蒸溜水 40 ml)과 0.03% H_2O_2 및 蒸溜水を 1:1:4 (v/v)의 比率로 만들어 約 5分間 浸漬하여 發色시켰다.²³⁾

위의 發色된 gel은 7% acetic acid로 脫色시킨 後 zymogram 作成資料로 하였다.

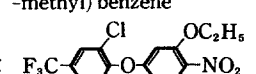
3. Oxyfluorfen 處理에 따른 同位酵素 電氣泳動의 差異

供試品種은 試驗 2에서와 같은 oxyfluorfen 耐性인 Chokoto와 感受性인 Weld pally였으며, 同一한 方法으로 4日間 育苗된 水稻幼苗를 藥劑處理에 供試하였다. 이들 幼苗의 뿌리部位에 부착된 vermiculite를 깨끗이 除去한 後 蒸溜水만의 無處理와 oxyfluorfen 10^{-4} 溶液이 담겨진 $\phi 2.5 \times 13$ cm 試驗管에 浸漬하고 고무栓으로 密封하여 4.5 KLux/30°C 人工光下에 置床하였다. 置床後 0(無處理), 3, 6, 12, 24時間에 試料를 採取하여 電氣泳動에 使用하게 하였다.

電氣泳動은 7% polyacrylamide gel (PAGE) 法에 準하였으며, 同位酵素로는 malate dehydrogenase (MDH), esterase (EST) 및 peroxidase (POX)의 3種으로서 諸般過程은 앞의 試驗 2에 提示한 바와 同一하였다.

藥劑의 情報은 다음 表에 提示한 바와 같으며, 分離된 band의 zymogram 作成과 peak 變動을 解析하기 위하여 densitometer로 scanning 하였다.

Chemical information of oxyfluorfen used.

Common & trade name	Oxyfluorfen & Goal
Chemical name	2-chloro-1-(3-ethoxy-4-nitrophenoxy)-4-(trifluoromethyl) benzene
Structural formula	
Formulation	23.5 EC
Solubility	0.1 ppm (water 25°C)

結果 및 考察

1. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 法에 의한 種實蛋白質의 電氣泳動 樣相

作物의 경우에는 諸般 環境(淘汰壓)에 適應하기 위해서 스스로 遺傳子型을 分化시켜 가며 固定케 되는 生態型分化性²⁴⁾이 크게 期待되지는 않으나 品種別로 種特異性을 具備하고 있을 可能性은 있으며, 따라서 除草劑에 대한 對應反應의 多樣性을 理解하기 위하여 蛋白質이나 核酸에 의한 生化學的 分類法이 強調되기에 이르렀다.^{13,14)} 특히 種內 變異幅이 적은 種實蛋白質에 대한 SDS-PAGE 法은 여러 學者들에 의하여 그 適合성이 肯定的으로 받아들여지고 있다.^{4, 6, 7, 11, 20, 25, 30)}

本 研究의 경우, oxyfluorfen에 耐性인 5品種과 感受性인 5品種의 種實蛋白質을 SDS-PAGE 法에 의하여 電氣泳動한 結果는 그림 1에 보인 바와 같이 19個의 band 分離를 얻을 수 있었다. 이들 band의 分離를 數值化하기 위하여 densitometer로 scanning한 結果는 그림 2에 나타낸 例와 같으며, 19種 band에 알파벳으로 名稱을 부여하고, 이들 peak가 갖는 面積을 구하여 (단, 相對吸光度로 測定된 面積이 全體의 0.5% 미만인 것은 除外 시

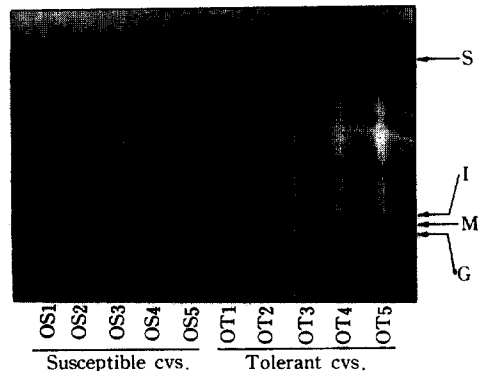


Fig. 1. Banding patterns of SDS-PAGE of proteins in 10 rice cultivars selected to oxyfluorfen [OS1: Mushakdanti, OS2: Weld Pally, OS3: HP1033, OS4: HP857, OS5: HP907, OT1: Chokoto, OT2: Aichiasahi, OT3: Agabyeo, OT4: IR3941, and OT5: Tabali].

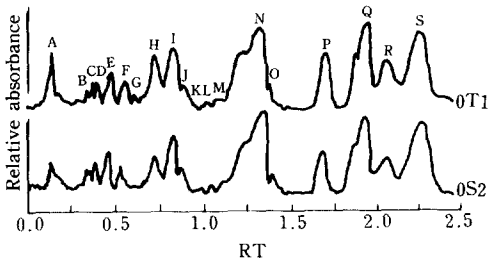


Fig. 2. Densitometer scans of protein bands in selected rice cultivars to oxyfluorfen. Scans taken from gels illustrated in Fig. 1.

켰음) 1-Q 相關에 의한 非類似係數를 얻은 다음에 類似群分類를 위한 dendrogram을 作成하였다 (그림 3).

즉 電氣泳動의 band pattern으로 보아 供試된 10品種은 대략 3個群으로 clustering이 되었는 데, 첫 群에는 OT1, OT2, OT3 및 OT5의 4個 耐性品種이 屬하게 되었고, 둘째 群에는 耐性 1品種(OT4)과 感受性 2品種(OS2, OS3)이 屬하였으며, 셋째 群에는 相互間에 類似性이 별로 없는 3個 感受性 品種들이 屬하는 結果였다. 이들 分類의 根據는 대부분의 感受性品種에서 G band가 거의 없었던 점과 H, N, O, P, Q, R, S band가 感受性보다 耐性에서 컸던 데 연유하는 것으로 判斷된다.

이런 結果는 分子量이 작은 蛋白分子의 band가 感受性보다 耐性品種群에서 널리 分布되고 있음을 뜻하는 것으로 解析되며, 특히 G band는 비록 minor band이긴 하지만 두 品種群을 特徵짓는 役割

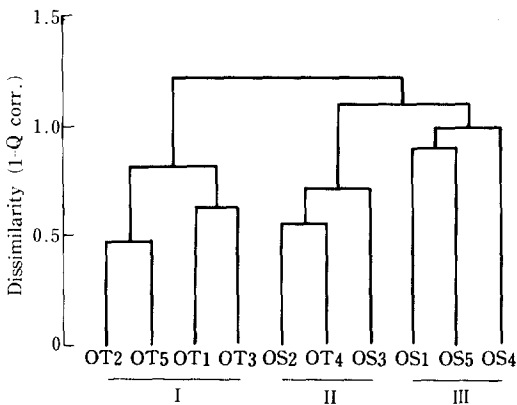


Fig. 3. Dendrogram in dissimilarity among 10 rice cultivars computed by 19 band areas from SDS-PAGE scans [Cultivars: Refer to Fig. 1].

을 하는 점에서 주목이 된다. 따라서 K, L, M, band에서 特異性을 보였던 OT4品種(IR3941)을 除外하고는 耐性品種의 特異性이 있는 것으로 判斷되었으며, 感受性品種들은 耐性品種의 共通性을 갖지 못할 뿐만 아니라 相互間의 band pattern이 多樣하게 나타나는 것으로 判斷되었다.

다만 Mastenbroek 등²⁰⁾이나 Comas 등⁶⁾은 種實蛋白의 PAGE法으로 충분한 特異 band가 確認이 되기 때문에 種分類에 이상적이라 하였으나 本試驗에서는 minor band나 major band에서의 量的인 差異를 確認할 수 있었을 뿐으로 oxyfluorfen에 대한 耐性的 判別이나 遺傳的 固定相을 說明하기는 어려운 것으로 생각되었다.

2. 7% Polyacrylamide gel(PAGE)法에 의한 同位酵素의 電氣泳動 樣相

本法에 의하여 同定한 同位酵素는 acid phosphatase(AcPH) 및 peroxidase(POX)였다. 즉 oxyfluorfen에 대한 耐性群 5品種과 感受性群 5品種間에 同位酵素 造成上的 共通性을 찾기 위하여 本試驗이 遂行된 것이다. Acid phosphatase에서는 全體적으로 4種의 band를 分離시킬 수 있었으며, oxyfluorfen에 耐性을 보였던 5品種은 B band의 量이 적고 C band를 갖는다는 共通點을 確認할 수 있었다(그림 4).

Wallace 등³⁰⁾은 선인장類의 種實蛋白質을 等電點電氣泳動法으로 acid phosphatase를 分離하여, 이들

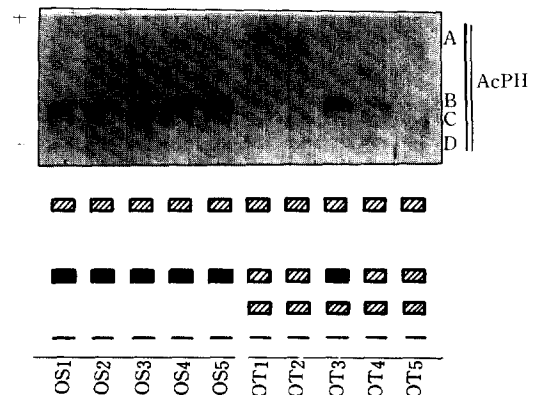


Fig. 4. Zymogram of acid phosphatase (AcPH) isozyme variation from 10 rice cultivars selected to oxyfluorfen (upper) and diagrammatic representation of band patterns in AcPH locus (lower) [Cultivars: Refer to Fig. 1].

植物種의 地理的 및 生態型別 類似性이 있음을 밝힌 바 있으며, 許 等¹²⁾은 種의 分布에 比例하는 band 類의 分離現象과 함께 벼에 대한 類似한 結論을 내린 바가 있다. 本 試驗에서도 供試品種의 band數는 많지 않았으나 OT3(Agabyeo)의 B band가 크게 나타났던 점만 除外시킨다면 耐性과 感受性 品種群間에 B band의 크기와 C band의 有無로 선명하게 區別이 가능하였기 때문에 acid phosphatase에 의한 oxyfluorfen 耐性遺傳研究에 有用한 結果로 받아들일 수 있을 것이다.

Peroxidase(POX)를 電氣泳動하여 band 特異성을 찾고, 이를 根據로 하여 品種 및 品種群間 共同性이나 標識遺傳子 探索研究에 利用한 研究例는 대단히 많다^{2, 5, 18, 19, 21, 32)}. 本 試驗의 경우, 數個의 major band와 수많은 minor band의 分離가 可能하였으나 densitogram을 통하여 判讀한 結果로는 불과 4個 minor band만을 品種群間의 特異性 說明資料로 確認할 수 있었다(그림 5).

즉 oxyfluorfen에 耐性を 보였던 品種들은 相對적으로 A, C, D band가 많고, B band는 거의 나타나지 않는 傾向이었다. 이 가운데서도 群間差異를 보다 선명하게 나타낸 점은, 耐性群의 경우 B band가 없고 C band가 많다는 데 있었다. 그러나 이들 共通의 差異마저도 肉眼으로 判別이 될만큼 선명한 것이 아니었고, 다만 densitogram을 통해 判讀 가능한 程度였기 때문에 이들 band 差異에 의한 品種群의 分類나 標識化에의 利用은 어려움이 따를 것으로 判斷되었다.

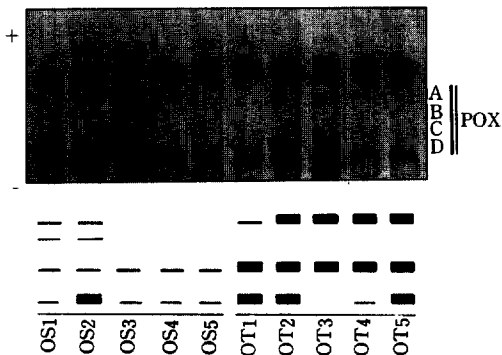


Fig. 5. Zymogram of peroxidase(POX) isozyme variation from 10 rice cultivars selected to oxyfluorfen(upper) and diagrammatic representation of band patterns in POX locus(lower) [Cultivars: Refer to Fig. 1].

3. Oxyfluorfen 處理에 따른 同位酵素 電氣泳動의 差異

選拔品種間의 oxyfluorfen (10^{-4} M) 處理後의 經時的인 MDH(malate dehydrogenase) band pattern을 例示하면 그림 6과 같다. 3個의 main band와 여러개의 minor band를 確認할 수 있었으나 試驗目的上 3個의 band를 選別할 수 있었다. oxyfluorfen에 耐성이었던 Chokoto 品種에서의 處理後 12時間에 B 및 C band에서 detect된 微量表現 現象을 例外로 친다면, 耐性品種의 特異성을 쉽게 判讀할 수 있었다. 즉 耐성이었던 Chokoto는 A band가 없고 B 및 C band가 oxyfluorfen 處理로도 크게 變化하지 않았지만 感受성이었던 Weld Pally에서는 A, B 및 C band 모두가 處理後 時間經過에 따라 消失되는 特性을 나타낸 것으로 볼 수 있었다. 반면에 處理後 24時間의 B 및 C band가 過多表現現象을 보인 것으로 判讀한다면, 耐性品種의 경우, A band에서의 差異만을 들어 그 特異성을 說明할 수 있을 것이다. 또한 band의 消失轉換은 大略 處理後 6時間 以後에서 나타나고 있었다.

MDH는 dimeric 分子를 가진 3類型의 同位酵素로서 電氣泳動에서는 3~4 同位酵素로 나타나며, 植物生理적으로는 미토콘드리아에서 TCA 회로에 관여하고, 光呼吸이나 glyoxylate 回路에 관여하거나 CO_2 固定에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 이런 觀點에서, 除草劑를 위시한 각종 環境耐性的의 研究에 MD

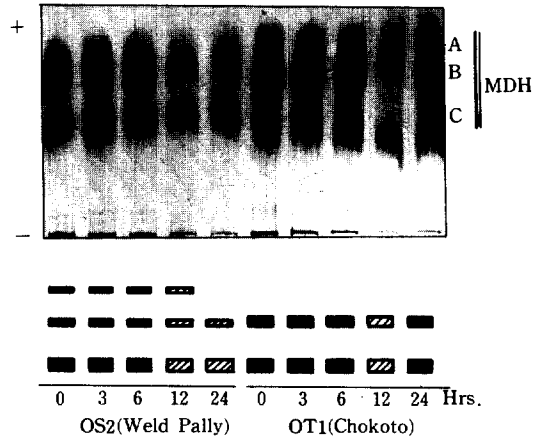


Fig. 6. Zymogram of malate dehydrogenase (MDH) isozyme variation as affected by treatment of oxyfluorfen and diagrammatic representation of band patterns in MDH locus(lower).

H pattern의 특異性を適用解析할 수 있는餘地가 많을 것으로 보인다.

反面에 peroxidase의 경우,

試驗2에서와 同一方式으로 얻은 品種들의 幼苗를 供試하였지만 無處理 혹은 10^{-4} M의 oxyfluorfen에서 다른 時間을 經過하며 生長 및 處理가 되었기 때문에 同一한 同位酵素를 分離시켰음에도 다소 差異를 나타내는 것으로 나타났다(그림 5와 그림 7, 8 參照). Peroxidase는 특히 植物의 生長速度나 活力^{18, 19)} 또는 苗令別⁵⁾로 극히 민감하게 band pattern에 差異를 보이기 때문에 Mastenbroek 등²¹⁾은 環境變異로서의 band를 정밀하게 관찰 할 필요가 있다고 하였다.

즉 本 試驗에서 分離시켜 densitogram을 作成한 結果, 品種에 따라 4(耐性)~5(感受性)個의 band를 確認할 수 있었다(그림 7). 즉 oxyfluorfen에 感受性인 Weld Pally는 無處理時에 A, B, C, D, E, band가 모두 높은 活性을 띠면서 선명하게 確認되었으나 oxyfluorfen 處理後의 時間이 經過됨에 따라 A band를 除外한 대부분의 band가 活力을 消失하면서 적어지는 傾向을 보였다. 특히 어떤 變化

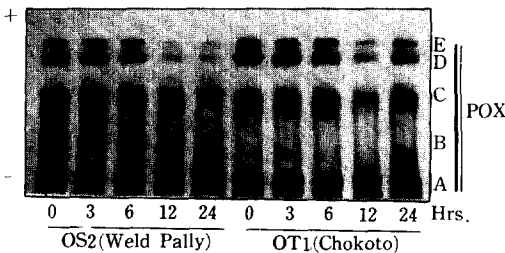


Fig. 7. Banding patterns of peroxidase(POX) isozyme variation as affected by treatment of oxyfluorfen.

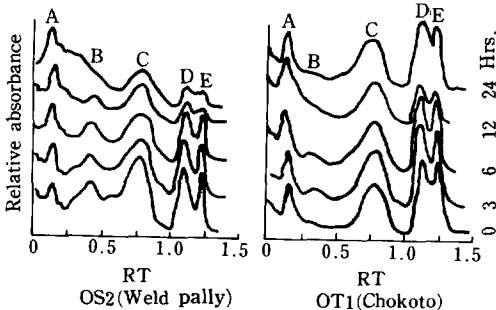


Fig. 8. Densitometric scans of peroxidase(POX) isozyme variation as affected by treatment of oxyfluorfen. Scans taken from gels illustrated in Fig. 7.

는 B, D, E band에서 민감하게 나타났다. 그러나 耐性이었던 Chokoto에서는 B band가 아예 나타나지 않았을 뿐만 아니라 대부분의 band에서도 活力이 떨어지면서 消失되어가는 傾向은 認定할 수 없었다(그림 8).

Oxyfluorfen에 대한 各 品種의 耐性機作과 關聯하여 peroxidase의 B band 및 A, C, D, E band가 갖는 植物生理的 機能을 再究明할 필요가 있는 것으로 判斷된다. Kim 등¹⁵⁾도 oxyfluorfen과 作用機作이 類似한 acifluorfen을 耐性植物로 알려진 大豆葉에 撒布하고 處理濃度에 따른 peroxidase의 活性增加現象을 報告한 바 있다.

本 試驗의 경우, A, C, D, E band를 통하여 耐性 品種이 peroxidase 活力을 지속적으로 유지시킬 수 있었던 것과 相應하는 結果로 解析이 된다. Peroxidase의 活性은 生長速度에 比例하며¹⁹⁾ 급격히 떨어지는 것은 植物體의 枯死와 並行되기 때문이다.¹⁵⁾ 그러나 淺野²²⁾는 paraquat에 抵抗性인 망초屬의 SDS-PAGE에 의하여 특異的인 band를 確認하였고, 이들의 活性도가 耐性에서 相對的으로 더 떨어지는 現象을 報告한 바 있어서 本 試驗의 peroxidase B band 경우와 비교가 될 것으로 보인다.

여에서 흔히 研究對象으로 취급되고 있는 同位酵素의 하나로서 esterase를 들 수 있다. 흔히 14個의 band를 얻으며 이 가운데 8個 band는 그 선명성에 비추어 遺傳背景의 研究에 특히 적합하다고 한다¹²⁾. Wu 등³³⁾이나 Villamil 등²¹⁾은 esterase가 品種間보다 品種內에서의 組織이나 種子間에 더욱 變異를 보이므로 環境變異 소거방식의 必要性이 있다고 하므로써 오히려 遺傳背景보다는 環境에 의한 機能變化를 研究하는데 適合성이 있을 것임을 암시하기도 하였다.

本 分析의 경우, oxyfluorfen(10^{-4} M) 處理에 따른 두 選拔品種에서의 esterase가 보인 經時的 變化는 그림 9에 提示한 바와 같았다. 대략 4個의 band를 確認할 수 있었다. 이를 densitogram으로 解析해 보면, oxyfluorfen에 耐性이었던 Chokoto는 A, C, D band가 뚜렷한 活性을 보였으며, oxyfluorfen 處理가 되더라도 별로 活性消失의 傾向이 심하지 않았으나 감수성이었던 Weld pally는 이들 band의 消失傾向이 뚜렷하였고, 특히 處理後 6時間 以後에는 急激히 떨어지므로써 體內代謝活動의 정지에 의한 枯死傾向을 나타내는 것으로 보였다(그림 10).

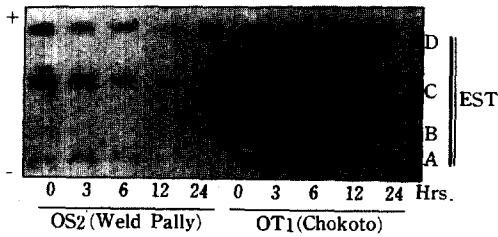


Fig. 9. Banding patterns of esterase (EST) isozyme variation as affected by treatment of oxyfluorfen.

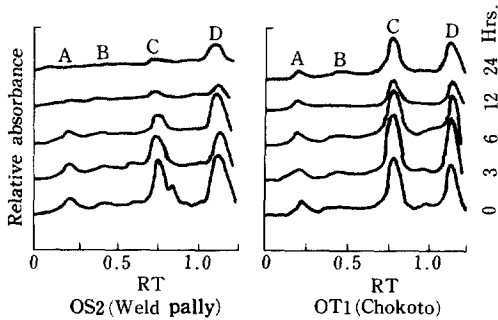


Fig. 10. Densitometric scans of esterase (EST) isozyme variation as affected by treatment of oxyfluorfen. Scans taken from gels illustrated in Fig. 9.

특히 esterase는 植物體 脂肪酸의 加水分解 酵素로서 이 過程을 통한 membrane의 變化는 耐冷性を 增大시키는 役割을 하므로, 植物에 따라서는 硬化(hardening)된 경우에만 發見되기도 한다⁹⁾ 따라서 本 試驗에서의 A, C, D band가 耐性品種에서 선명하게 나타나 經時的으로 維持되었던 점은 이와 類似한 結果로도 解析이 된다. 이의 生理的 研究와 함께 보다 면밀하게 檢討가 이루어지길 바란다. 또한 이러한 여러 點으로 볼 때, 本 研究에서 esterase의 特異 band가 品種間에 찾아지지 않았던 데 주목할 필요가 있으며 이는 Wu 등³³⁾, Wilkinson 등³²⁾의 結果와 類似하게 생각되었으며 다른 한편으로는 Mastenbroek 등²⁰⁾나 Villamil 등²⁹⁾에서와 같이 oxyfluorfen에 의한 環境영향을 判別하는 데는 매우 이상적인 것으로 생각되었다.

摘 要

Oxyfluorfen에 代表的인 耐性群(Chokoto, Aichiasahi, Agabyeo, IR 3941, Tabali)과 感受性品種群(Mushakdanti, Weld pally, HP 1033, HP 857,

HP 907)을 供試하여 種實蛋白質(SDS-PAGE法)과 同位酵素(acid phosphatase, peroxidase: 7% PAGE法)의 電氣泳動 pattern을 分析하고, oxyfluorfen 10⁻⁴M 處理後의 同位酵素(malate dehydrogenase, peroxidase, esterase) pattern의 特異性を 確認하므로써 oxyfluorfen 耐性差異와 이들 電氣泳動 pattern 差異가 갖는 聯關性を 알고져 하였다.

結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 種實蛋白質의 電氣泳動에서는 19種 band를 찾아볼 수 있었고, 두 品種群間에 非類似성이 있는 것으로 clustering되었다. 이는 感受性群에서 G band가 없고, H, N, O, P, Q, R, S band에서 活性이 낮았던 데 기인한다.

2. 品種群間的 同位酵素 分析結果, 4個의 acid phosphatase band 가운데 耐性群은 B band의 活性이 낮으나 特異的으로 C band를 갖는 共通點이 있었다. Peroxidase의 4個 minor band에 대하여는 耐性群이 A, C, D band의 活性이 높고 B band의 活性은 거의 없었던 特異성이 있었다.

3. Oxyfluorfen 處理에 기인한 同位酵素의 經時的 變化로 보아, 耐性인 Chokoto에서는 malate dehydrogenase의 3個 band 가운데 A band의 活性은 거의 없었고 B 및 C band의 活性은 特續的으로 높게 維持되는 特異성이 있었다. Peroxidase의 5個 band 가운데 B band는 耐性인 Chokoto에서 발견되지 않았으나 A, C, D, E band는 經時的으로도 消失傾向이 크지 않았다. Esterase는 대략 4個의 band로 分離되었는데 耐性인 Chokoto는 A, C, D band가 높은 活性을 갖고 特續的으로 유지되는 特異성을 나타내었다.

引 用 文 獻

- Anderson, N.G., Anderson N.L., (1978) Anal. Biochem. 85: 331-340.
- 淺野祐臣(1988) ハルジオンのパラコート抵抗性. 一主としてパラコート處理後のタンパクおよびパーオキシターゼの變化一. (日) 雜草研究 33-別: 207-208.
- Cardy, B.J., C.W. Stuber, and M.M. Goodman (1986) Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize. Insti-

- tute of Statistics Mimeograph Series No. 1317. North Carolina State Univ.
4. Cerdeira A.L., A.W. Cole, and D.S. Luthe (1985) Cowper (*Vigna unguiculata*) Seed Protein Response to Glyphosate. *Weed Sci.* 33 : 1-6.
 5. Choi, S.Y., K.S. Lee, and K.H. Ponk (1986) Studies on the Physiological Chemistry of the Spring Growth Habits in Naked Barley. V. Changes in the Isozyme Patterns and Activities of peroxidase during the differentiation. *Kor. J. Crop Sci.* 31-3 : 375-382.
 6. Comas C.I., J.H. Hunziker, and J.V. Crisci (1979) Species Relationships in *Bulnesia* as Shown by Seed Protein Electrophoresis. *Biochem. Syst. Ecology* 7 : 303-308.
 7. Darmency H., J. Landry and J. Mosse (1981) Biochemical Data on Blackgrass Prolamines and Their Importance for Taxonomic Purposes. *Biochem. Syst. Ecology* 9-213 : 171-174.
 8. Davis, B.J. (1964) Disc Electrophoresis-II. Method and Application to Humans Serum Proteins. *N.Y. Acad. Annuals* 121 : 404-427.
 9. Devlin R.H. and F.H. Witham (1983) *Plant physiology*, Will and Grant Press, Boston.
 10. Ferguson M.M. (1981) Identification and Species Characterization of Some North American Minnows by Electrophoresis. *Biochem. Syst. Ecology* 9-1 : 89-91.
 11. Fisher H.H., R.A. Menendez, L.S. Daley, D.R. Spencer, and G.D. Crabtree (1987) Biochemical Characterization of Itchgrass (*Rottboellia exaltata*) Biotypes. *Weed Sci.* 35 : 333-338.
 12. 許文會. 1986. 벼의 遺傳과 育種. 서울大學校 出版部.
 13. Ishizuka K. (1975) Biochemical and Physiological Approaches to Species Specificity in Herbicide Science. *Weed Res. (Jap.)* 20-2 : 49-54.
 14. Ishizuka K. (1983) Biochemical and Physiological Approaches to Herbicide Selectivity. *Weed Res. (Jap.)* 28-4 : 229-242.
 15. Kim H.J. and H.G. Park (1984) Application of Electrophoresis in Testing the Genetic Purity of F Hybrid Seeds of Radish (*Raphanus sativus*). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 25(4) : 256-262.
 16. Kim T.W. and B.H. Kang (1987) Peroxidase Activity in Leaf Tissue of Soybean (*Glycine max* M.) After Foliar Application of Acifluorfen. *Kor. J. Weed Sci.* 7(Suppl.) : 27-28.
 17. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
 18. Lee, K.O. and Y.H. Kang (1983) Studies on Peroxidase Isozymes of Soybean (*Glycine max* L.) Calluses. I. Comparisons on peroxidase isozyme patterns in growth periods of calluses from soybean seedling plant organs. *Kor. J. Plant Tissue Cult.* 10-1 : 5-14.
 19. Lee, K.O. and Y.H. Kang (1983) Studies on Peroxidase Isozymes of Soybean (*Glycine Max* L.) Calluses. II. Comparisons on Peroxidase Isozyme Activities in Growth Periods of Calluses from Soybean Seedling Plant Organs. *Kor. J. Plant Tissue Cult.* 10-1 : 15-26.
 20. Mastenbroek I., C.E. Cohen and J.M. J. Dewet (1981) Seed Protein and Seedling Isozyme Pattern of Zea Mays and Its Closest Relatives. *Biochem. Syst. Ecology* 9-213 : 179-183.
 21. Mastenbroek O., P. Hogeweg, J. Heringa, G.J. Niemann, G.V. Nitevecht and J.V. Brederode (1984). Isozyme Variation in *Silene Pratensis* : a Response to Different Environments. *Biochem. Syst. Ecology.* 12-1 : 29-36.
 22. Park, W.H., and H. Stegemann (1979) Rice Protein Patterns. Comparison by Various PAGE-techniques. *Z. Acker-u. Pflanzbau* 148 : 446-454.
 23. Park, W.H., Y.H. Ko, Y.J. Yoo and J.Y. Lee (1982). The Change of Peroxidase activity in Soybean Seed Followed by Infection with *Cercospora Kikuchii*. *The Korean Journal of Plant Protection* 21 : 23-26.

24. Price S.C., R.W. Allard, J.E. Hill, and J. Naylor (1985) Association between Discrete Genetic Loci and Genetic Variability for Herbicide Reaction in Plant Populations. *Weed Sci.* 33 : 650-653.
25. Qard M. and J.M.J. Dewet. (1983) Electrophoretic Variation of Seed Proteins Among U. S. Populations of *Tripsacum Dactyloides* Var. *Dactyloides*. *Biochem. Syst. Ecology.* 11-1 : 41-45.
26. Son, E.R., W.M. Park, Y.S. Lee, S.D. Ahn and S.R. Chun. (1984) Comparison of Isozyme Patterns Among Varieties of Ginseng, *Panax* spp. *Kor.J. Crop Sci.* 29-4 : 350-355.
27. Tateoka Tuguo (1983) Plant Speciation and Taxonomy. 養賢堂
28. Ueki K. (1981) Present Topics on Weed Research. *Weed Res. (Jap.)* 26-2 : 78-84.
29. Villamil C.B., R.W. Duell, D.E. Fairbrothers, and J. Sadowski, (1982) Isoelectric Focusing of Esterases for Fine Fescue Identification. *Crop Sci.* 22 : 786-793.
30. Wallace R.S. and D.E. Fairbrothers (1986) Isoelectrically Focussed Seed Proteins of Populations of *Opuntia Humifusa* (Raf.) Raf. (*Cactaceae*). *Biochem. Syst. Ecology* 14-4 : 365-369.
31. Werth C.R., J.L. Riogel, and N.W. Gillespie (1984) Genetic Uniformity in an Introduced Population of Witch weed (*Striga asiatica*) in the United States. *Weed Sci.* 32 : 645-648.
32. Wilkinson C.A., C.L. Mulchi, and M.K. Aycock, Jr. (1985) Polyacrylamide gel electrophoresis for Cultivar Identification in Tobacco. *Crop Sci.* 25 : 971-974.
33. Wu L., A.H. Harivandi, J.A. Harding, and W.B. Davis. (1984) Identification of Kentucky Bluegrass Cultivars with Esterase and Phosphoglucomutase Isoenzyme Markers. *Crop Sci.* 24 : 763-768.