

# Oxyfluorfen에 대한 耐性 및 感受性 벼品種의 生理活性 機構\*

V. 抗酸化劑 含量 및 GST活性

鞠龍仁 · 具滋玉 · 朴魯東\*\*

## Different Physiological Activity of Selected Rice Cultivars to Diphenylether Herbicide, Oxyfluorfen\*

V. Different Content of Antioxidant and GST Activity

Kuk, Y.I., J.O. Guh and R.D. Park\*\*

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the content of antioxidant and GST activity of the oxyfluorfen-tolerant and -susceptible rice cultivars with barnyardgrass, a typical susceptible weed in accordance by oxyfluorfen treatment.

The content of vitamin C was higher in the tolerant rice cultivar than in the susceptible rice cultivar and barnyardgrass. The contents of vitamin E, carotenoid, glutathione(GSH, GSSG, total glutathione) were not different between the tolerant and susceptible plants.

In the case of the content of vitamin C due to the treatment of oxyfluorfen, the tolerant rice cultivars, Hawon and Baru decreased less than the susceptible rice cultivars and barnyardgrass. After the treatment of oxyfluorfen the contents of vitamin E and GSH in the tolerant rice cultivars were higher than in the susceptible rice cultivars or barnyardgrass. But in the content of carotenoid was greater in the tolerant rice cultivars than in the susceptible rice cultivars but they didn't have any difference in comparison with the susceptible barnyardgrass. And there was no difference in the content of GSSG between the tolerant and susceptible plants.

When CDNB or oxyfluorfen were used as substrate, the GST activity, was higher in the tolerant rice cultivars than in the susceptible rice cultivars or barnyardgrass. After the treatment of oxyfluorfen the GST activity was not induced in the rice, but was induced in the barnyardgrass. Even after the treatment of acifluorfen, bifenox and oxadiazon the GST activity was not induced in the rice cultivars.

Key words : Oxyfluorfen, rice, tolerance, antioxidant, glutathione S-transferase(GST)

\* 본 연구는 한국과학재단 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부임.

\*\* 全南大學校 農科大學(College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

<1996. 2. 6 접수>

## 緒 言

DPE계가 엽록소의 생合成에 관여할 것이라는 증거는 tetrapyrrole 생合成의 저해제를 사용하면 식물을 DPE계 除草劑로부터 보호할 수 있다거나, DPE계를 처리할 경우 protoporphyrin IX(PPIX) 蓄積을 그 증거로 들 수 있다<sup>25)</sup>. 특히 PPIX은 훌륭한 photosensitizer로서 반응성이 강한 singlet oxygen을 형성하는 점이 잘 알려져 있음을 고려할 때<sup>2)</sup>, DPE계 除草劑의 원인물질이 PPIX이며, 作用點이 protoporphyrinogen oxidase(protox)일 것이라는 가설<sup>26)</sup>이 일반적으로 받아들여지고 있다. PPIX는 광증감반응에 의해 강한 산화력을 갖는 活性酸素인 一重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)를 발생시키므로써<sup>1)</sup> PPIX 蓄積이 膜脂質 등을 過酸化시키는 원인이 되는데 따른 것으로 생각되었다. 또한 PPIX에 의해 생성된 活性酸素를 消去시키는 抗酸化物質 vitamin C<sup>3,22)</sup>, E<sup>14,23)</sup>, glutathione<sup>21,32,34)</sup>, carotenoid<sup>12,15)</sup> 등에 대한 연구 보고들도 많다.

Finckh와 Kunert<sup>6)</sup>는 oxyfluorfen의 過酸化가 vitamin C와 E의 비율이 적당할 때(10-15:1) 피해가 감소된다고 하였고, 그 총량이 *in vivo*에서의 藥劑에 대한 抵抗성과 관계가 있는 것으로 몇몇 식물<sup>6)</sup>이나 조류<sup>16)</sup>에서도 보고된 바 있다. Vitamin E는 脂溶性의 抗酸化劑로서 脂質 radical의 消去能力을 갖고 있는데, 이것과 같은 작용을 하는 ethoxyquin이 DPE계 除草劑에 의한 過酸化를 방어하는 것으로 보고<sup>14,23)</sup>되었다. Orr와 Hess<sup>30)</sup>는 抗酸化劑 vitamin E는 DPE가 처리된 오이차엽에서 membrane leakage가 억제됨을 발견하였고, DPE계 除草劑 또는 paraquat 처리 후에 식물에서 脂質過酸化의 감소가 vitamin C의 抗酸化作用에 의해 기인된다고 하였다<sup>14)</sup>. 콩에서도 증가한 glutathione reductase (GR) 活性과 glutathione, vitamin C와 같은 抗酸化劑의 높은 생산은 過酸化를 막는데 중요한 역할을 한다고 보고하였으며<sup>34)</sup>, DPE계 除草劑인 oxyfluorfen과 bifenoxy의 피해는 α-tocopherol, mannitol 및 hydroquinone의 前處理로 경감되는

것으로 보고<sup>27)</sup>된 바 있다. Glutathione은 스트레스<sup>33)</sup> 또는 acifluorfen<sup>34)</sup> 처리에 의해서 그 함량이 증가된다고 보고되었으며, 抗酸化劑로서의 역할 이외에 chloracetanilide계 除草劑와 결합하여 除草劑를 無毒化시키는 역할을 하는 것으로 보고되었다<sup>17,33)</sup>.

除草劑 選擇성은 주로 除草劑를 代謝적으로 無毒化시키는 식물의 능력 차이에 기인되고 대부분의 耐性 식물은 除草劑를 빠르게 代謝하는 반면, 感受性 식물은 除草劑를 代謝시키기 어렵고, 除草劑가 生理活性 작용의 부위에 도달하는 것을 막는 비율이 상대적으로 느리다고 보고<sup>36)</sup>하였다. Glutathione 抱合反應은 식물 상태에서 異物質인 除草劑가 glutathione S-transferase(GST)의 觸媒作用에 의해 식물체내의 glutathione과 결합해서 보다 수용성이고 除草劑活性을 잃는 화합물을 형성한다<sup>7,8,9,28)</sup>.

GST는 nitrodiphenyl ether계인 fluorodifen<sup>8)</sup>, acifluorfen<sup>9)</sup>, fomesafen<sup>5)</sup>과 chloracetanilide계인 propachlor<sup>18)</sup>, alachlor<sup>28)</sup>, metolachlor<sup>4)</sup> 등을 포함한 폭넓은 除草劑 代謝에 있어서도 중요한 역할을 한다고 보고되었다.

DPE계 選擇성에 관한 연구에서 Frear와 Swanson<sup>8)</sup>은 感受性인 오이, 토마토보다 抵抗性인 목화, 옥수수, 콩 등에서 GST 活性이 높았음을 보고한 바 있고, fluorodifen<sup>8,31)</sup>은 spruce 懸濁培養 細胞에서 glutathione 抱合 代謝에 의해 ether 결합이 끊어지고 s-(2-nitro-4-trifluoromethyl-phenyl)이 glutathione과 抱合體를 형성한다고 하였다.

Acifluorfen의 代謝에 GST가 중요한 비중을 차지하고 있는 것으로 보아 이 酵素의 活性과 농도가 DPE계의 選擇성에 영향을 미치는 것으로 보인다<sup>9)</sup>. 콩에서 acifluorfen의 選擇성은 homoglutathione과 conjugation에 의한 ether 결합의 分解로 유도되지만 구조가 유사한 oxyfluorfen에서는 일어나지 않는다고 하였다<sup>9)</sup>.

Lamoureux 등<sup>17)</sup>은 가문비나무속 細胞에 fluorodifen을 처리하였을 때, 1주일 후에 존재하는 주요 代謝產物은 GSH의 結合물이었다고 하였고, 또한 metolachlor의 藥害에 대한 보호정도는 GST 活性과 상관이 있었다고 하였다<sup>5)</sup>.

따라서 본 연구는 oxyfluorfen에 耐性 및 感受性 벼品種들과 感受性 피간에 生理活性 차이를 抗酸化劑 含量과 GST 활성 차이로 알아보고자 하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 抗酸化 低分子物質 含量

前報<sup>13)</sup>와 동일한 공시재료를 최아시켜 10일간 육묘한 후  $10^{-6}$  M로 조제한 oxyfluorfen 용액에 식물체 전체를 2시간 침지처리하고 暗狀態에 24시간 배양 후 光  $93.1 \mu E \cdot m^{-2} \cdot S^{-1}$ 에 0, 2, 4, 6시간 노출시켜 抗酸化劑 含量을 다음과 같이 분석하였다.

가. Vitamin C (ascorbic acid) : 저온에서 각 식물체 0.25g을 5% TCA 4ml로 마쇄한 다음 원심분리(12,000 rpm : 20분, 4°C) 후 상등액 0.54ml를 취하여 反應液(85%  $H_3PO_4$ , 0.16ml, 0.5% dipyriddy 2.74ml, 1%  $FeCl_3$  0.56ml)에 넣고 30°C에서 55분간 반응시켰다. 이를 525nm에서의 흡광도를 측정하여 표준 ascorbic acid로 작성한 定量曲線을 이용하여 定量하였다<sup>19)</sup>.

나. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) : 각 식물체 0.25g을 100% ethanol 5ml로 추출하여 원심분리(12,000 rpm, 15분, 4°C)하고 상등액에 0.3ml(ascorbic acid 0.3g과 KOH 8g/5ml)를 넣어 50°C에서 한시간 동안 비누화(saponification) 시켰다. 이어 물을 가하고 petroleum ether로 층 분리 후 petroleum ether 층을 모아 질소가스하에서 건조시키고 ethanol 5~10ml로 녹여 螢光 分光光度計를 이용하여 Ex 290nm, Em 325nm 조건에서 분석하였다<sup>6)</sup>. 표준물질로 작성한  $\alpha$ -tocopherol의 定量曲線을 이용하였다.

다. Carotenoid : 각 식물체 0.5g을 methanol 7ml로 마쇄 후 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상등액 5ml에 n-hexane 5ml을 넣어 층을 분리시킨 후 carotenoid 성분을 함유한 n-hexane 층에 대하여 分光分析하였다. Phytoene은 287nm에서, phytofluene은 347nm,  $\beta$ -carotene은 453nm에서 상대적인 함량을 구하였다<sup>24)</sup>.

라. Glutathione : 다음의 flow chart를 따라서 定量하였다<sup>11)</sup>.

0.25 g tissue + 1 ml 25%  $HPO_3$  + 3.75 ml phosphate - EDTA buffer pH 8.0

Homogenize  
Centrifuge(7,000 g)

Supernatant

#### GSH assay

0.5 ml Supernatant  
4.5 ml 0.1 M Potassium phosphate buffer pH 8.0  
|  
Mix  
|  
100  $\mu$ l of Mixture  
1.8 ml 0.1 M Potassium phosphate buffer pH 8.0  
200  $\mu$ l OPT solution(1mg/10ml MeOH)  
|  
Incubate at room temperature for exactly 15 min  
|  
Determine fluorescence at 420 nm (Excitation at 350 nm)

#### GSSG assay

0.5 ml Supernatant  
200  $\mu$ l NEM (0.04 M)  
|  
Incubate at room temperature for 20-30 min  
Add 4.3 ml NaOH (0.1 N)  
|  
Mix  
|  
100  $\mu$ l of Mixture  
1.8 ml NaOH (0.1N)  
100  $\mu$ l OPT solution  
|  
Incubate at room temperature for exactly 15 min  
Determine fluorescence at 420 nm (Excitation at 350 nm)

## 2. GST 活性 分析

공시식물을 10일간 육묘하여 oxyfluorfen  $10^{-4}$  ~  $10^{-7}$  M로 조제한 용액에 식물체 전체를 2시간 침지처리하고 光( $93.1 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ )에 6시간 노출하였으며, 또한 oxyfluorfen과 作用機作이 유사한 acifluorfen, bifenox 및 oxadiazon을  $10^{-6}$  M로 조제한 용액에 식물체 전체를 2시간 침지처리하고 光에 노출하여 GST 活性을 분석하였으며, CDNB와 oxyfluorfen을 기질로 사용하였다.

식물체 1g을 1mM sodium metabisulfite를 함유한 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer(pH 6.8) 5ml를 넣어 마쇄하고 여과하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 20,000g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이들 시료 0.1 ml와 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer(pH 7.4) 1.9ml, 3.3 mM GSH 0.9ml, 30mM CDNB 0.1ml를 혼합한 즉시 分光光度計를 이용하여 340nm에서 흡광도의 변화를 1분간 측정하였다<sup>35)</sup>. 단, oxyfluorfen을 기질로 사용할 경우에는 oxyfluorfen 최종 농도가  $10^{-4}$  M이 되도록 하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 體內的 抗酸化劑 含量

공시 식물들 자체가 보유하고 있는 抗酸化劑 含量 차이가 生理活性 요인에 관여하는지를 알아 보았다(표 1).

Vitamin C 함량은 耐性 벼品種들에서 115~137  $\mu\text{g/g}$  FW 범위로 분포하고 있으나, 感受性 벼品種들과 피는 88~103  $\mu\text{g/g}$  FW 범위로 분포하고 있어 耐性 벼品種들이 感受性 벼品種들이나 피보다 많았다. Vitamin E( $\alpha$ -tocopherol) 및 carotenoid 함량은 耐性和 感受性種들간에 차이가 없었다. 李<sup>20)</sup>는 광엽식물이 벼과식물보다 다량의 비타민을 함유하면서도 藥害程度는 벼과식물보다 광엽식물에서 더 많았던 점으로 미루어 두 비타민의 많고 적음과 藥劑의 生理活性 차이와는 관련성이 적은 것으로 보고함으로써 본 연구의 결과와 유사성이 있었다.

Glutathione(GSH, GSSG, total glutathione) 함량은 耐性和 感受性 벼品種들간에 차이가 없었으나, 感受性인 피에서는 벼品種들보다 이들 함량이 유의적으로 적었다. Breaux 등<sup>1)</sup>은 chloracetanilide에 耐性인 식물이 感受性인 식물보다 다량의 glutathione을 體內에 함유하고 있다고 하였으나, 본 연구 결과 glutathione의 양적 차이는 生理活性 차이에 거의 영향하지 않는 것으로 보인다.

### 2. Oxyfluorfen 處理 後 抗酸化劑 含量

Oxyfluorfen 처리 후 暗條件에서 24시간 배양하고 光露出 0, 2, 4, 6시간 후에 vitamin C 함량 변화(그림 1)를 보았다.

Vitamin C 함량은 光露出 시간이 경과함에

Table 1. Comparison in antioxidant contents( $\mu\text{g/g}$  fresh weight) among selected plant species.

Species	Vitamin		Carotenoid	Glutathione		
	C	E		GSH	GSSG	Total
..... Tolerant .....						
Rice						
Hawon	118.7 ± 13.2	10.9 ± 0.3	318 ± 20.5	210 ± 7	400 ± 29	610
Hunan 31	137.9 ± 15.8	6.7 ± 0.2	-	220 ± 10	425 ± 30	645
Baru	115.3 ± 2.5	8.4 ± 0.6	310 ± 25.3	236 ± 37	467 ± 45	703
..... Susceptible .....						
Rice						
HP857	97.4 ± 5.6	8.9 ± 0.3	357 ± 20.5	215 ± 17	473 ± 57	663
HP907	88.0 ± 3.2	10.3 ± 0.4	-	190 ± 15	415 ± 37	605
HP1033	94.3 ± 7.7	8.2 ± 0.5	-	223 ± 20	471 ± 50	694
Weldpally	88.8 ± 4.2	9.4 ± 0.2	294 ± 15.9	237 ± 18	415 ± 72	652
Barnyardgrass	103.0 ± 5.5	8.6 ± 0.1	447 ± 32.7	59 ± 4	94 ± 12	153

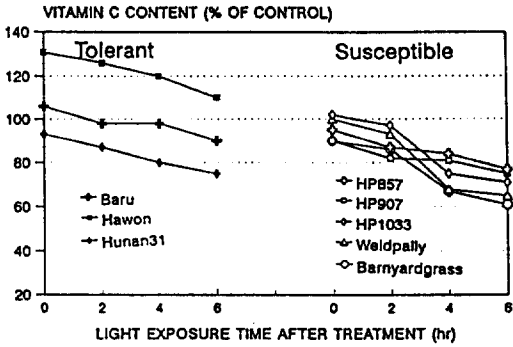


Fig. 1. Change of vitamin C contents in selected plant species after treatment of oxyfluorfen.

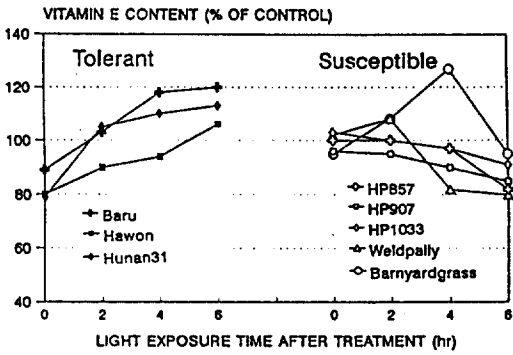


Fig. 2. Change of vitamin E contents in selected plant species after treatment of oxyfluorfen.

따라 감소하였고, **내성** 벼品種 Hawon과 Baru에서만 **感受性** 벼品種들이나 피보다 감소 정도가 적었다. 따라서 vitamin C의 함량 차이는 oxyfluorfen에 대한 **내성**에 별다른 영향을 미치지 않을 것으로 보이며, 단일 **抗酸化劑**에 의한 영향보다는 다양한 **抗酸化劑**에 의해 복합적으로 영향이 있을 것으로 생각된다.

Vitamin E의 oxyfluorfen에 대한 영향은 그림 2와 같다. **내성**인 벼品種들은 光露出 시간이 경과할수록 vitamin E의 함량이 증가하나 **感受性** 벼品種들은 감소하는 경향을 보였다. 반면에 **感受性**인 피에서는 **내성** 벼品種들보다 vitamin E의 증가율이 높았으나 4시간 이후에는 vitamin E의 함량이 급속히 감소되었다. Orr와 Hess<sup>30)</sup>는 DPE계가 처리된 오이작엽에서 membrane leakage를 억제시켰다고 하였고, 또한  $\alpha$ -tocopherol과 **活性酸素種**의 scavenger인 D-mannitol 및 hydroquione을 처리하게 되면 부분적으로 oxyfluorfen과 bifenoxy의 피해로부터 보호할 수 있다고 하였다<sup>27)</sup>. 따라서 본 실험의 경우에도 처리 후 光露出 시간이 경과되더라도 **내성**品種들에선 vitamin E 함량이 증가했던 것이 앞의 연구자와 유사한 경향이었던 것으로 해석된다. 이상의 결과로 볼 때 vitamin E는 oxyfluorfen에 대한 **내성** 要因으로 작용하는 것으로 보였다.

Oxyfluorfen 처리 후 6시간에 carotenoid의 성분량(phytoene, phytofluene 및  $\beta$ -carotene)의 변화(표 2)를 보면, **내성**인 벼品種들에서는 **感受性** 벼品種들보다 함량이 높았는데, 특히 **내성** 벼品種인 Baru에서 무처리에 비해 상대적으로 높았다. 그러나 피는 **내성**인 벼 Baru와는 함량 차이가 없었으나, 벼 Hawon보다는 오히려 높았기 때문에 carotenoid 함량 차이가 生理活性 차이에 미치는 영향은 적었던 것으로 사료된다.

Oxyfluorfen 처리에 의해 발생된 **活性酸素 radical**의 종류를 不活性化<sup>6,19,38)</sup>할 수 있는 GSH

Table 2. Change of carotenoid contents(% of control) of selected plants at 6 hours after treatment of oxyfluorfen.

Species	Phytoene	Phytofluene	$\beta$ -Carotene	Total
..... Tolerant .....				
Rice				
Hawon	88	101	95	95
Baru	124	138	105	119
..... Susceptible .....				
Rice				
HP857	78	73	53	87
Weldpally	75	65	71	81
Barnyardgrass	98	116	107	128

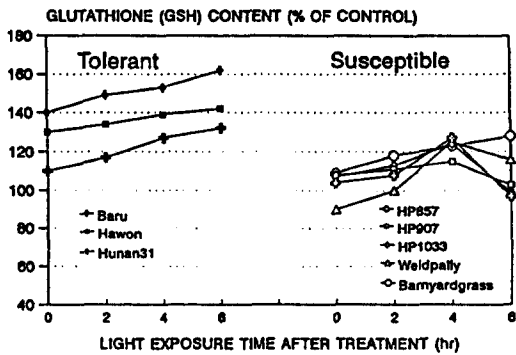


Fig. 3. Change of glutathione(GSH) contents in selected plants after treatment of oxyfluorfen.

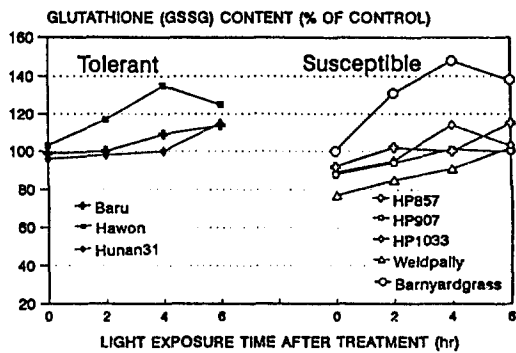


Fig. 4. Change of glutathione(GSSG) contents in selected plants after treatment of oxyfluorfen.

의 함량 변화(그림 3)는 처리 후 光露出 시간이 경과할수록 耐性인 벼品種에서는 무처리에 비해 증가하였고, 感受性인 벼品種들에서도 증가하였으나 4시간 이후에는 감소하였다. 그러나 GSH 함량의 증가폭은 耐性 벼品種들이 感受性인 벼品種들보다 훨씬 컸다. 感受性인 피의 GSH 함량은 처리 후 光露出 시간이 경과함에 따라 증가하나 耐性 벼品種들보다는 증가폭이 훨씬 적었다.

Glutathione은 스트레스 또는 oxyfluorfen 처리에 의해서 그 함량이 증가되었다는 보고<sup>17,33)</sup>와 본 연구의 결과는 거의 일치하는 경향을 보였다. 즉 oxyfluorfen 처리 후 GSH의 항산화 능력은 耐性 벼品種들이 感受性 벼品種들이나 피보다 뛰어났기 때문에 이들 능력의 차이가 生理活性 차이와 밀접한 관련성이 있을 것으로 사료된다.

Oxyfluorfen 처리 후 산화형 glutathione(GSSG)에 대한 함량 변화는 그림 4와 같았다. GSSG 함량은 光露出 후 4시간 또는 그 이후에도 함량이 증가하였는데, 이것은 환원형인 GSH가 活性酸素를 消去한 후 산화형인 GSSG로 변하기 때문에 시간의 경과와 함께 증가하는 것으로 보인다. 반면에 oxyfluorfen 처리 후 GSSG 함량은 耐性 벼品種 Hawon을 제외하고 感受性 벼品種과 큰 차이가 없었다. 반면에 感受性 피에서는 耐性 벼品種들보다 오히려 GSSG 함량 증가가 컸다.

따라서 抗酸化劑에 의한 生理活性 차이는 하나의 抗酸化劑에 의하기보다는 다양한 抗酸化劑의 복합적인 역할에 의해 야기될 것으로 보인다.

### 3. GST 活性

각 식물에서 GST를 추출하여 *in vitro*에서 oxyfluorfen 농도에 따른 반응을 본 결과(그림 5), oxyfluorfen 농도가 증가할수록 活性이 증가하는 경향이므로 oxyfluorfen이 GST 기질로서 사용될 수 있음이 시사되었다.

耐性 및 感受性 식물들 자체가 보유하는 GST 活性이 oxyfluorfen에 대한 耐性に 관여하는지를 조사하였다(표 3). 기질로서는 CDNB와 oxyfluorfen을 사용하였다.

먼저, CDNB 기질을 사용했을 때, 耐性 벼品種들은 276~390n mole/g FW 범위의 GST 活性을 보였으나, 感受性 벼品種들과 피는 181~

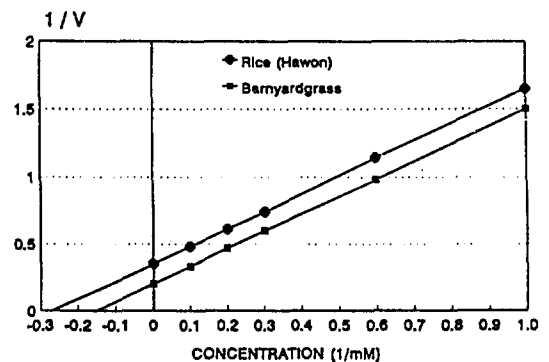


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of GST [Oxyfluorfen used as a substrate].

**Table 3.** Glutathione S-transferase (GST) activity of selected plants.

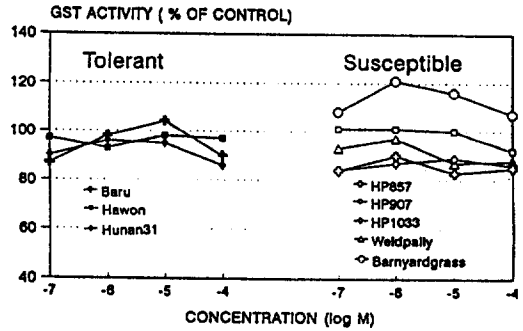
Species	GST activity (n mole/g FW/min)	
	CDNBa	Oxyfluorfenb)
	..... Tolerant .....	
Rice		
Hawon	390 ± 20.3	87 ± 6.2
Hunan 31	353 ± 19.6	142 ± 13.2
Baru	276 ± 13.2	83 ± 8.9
	..... Susceptible .....	
Rice		
HP857	182 ± 14.5	77 ± 8.3
HP907	215 ± 10.3	65 ± 7.2
HP1033	226 ± 9.9	52 ± 7.2
Weldpally	250 ± 19.7	56 ± 5.5
Barnyardgrass	181 ± 16.3	68 ± 6.5

a) GST activity measured using CDNB as substrate.  
 b) GST activity measured using  $10^{-4}$  M oxyfluorfen as substrate.

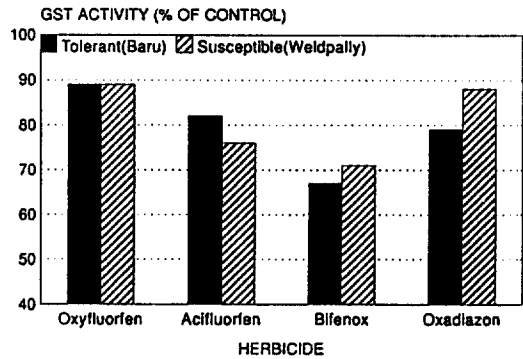
250n mole/g FW 범위의 비교적 낮은 활성을 보였다. 따라서 CDNB 기질에 의한 GST 활성은 耐性 벼品種들이 感受性 벼品種들과 피보다 월등히 높은 경향이였다.

Oxyfluorfen을 기질로 사용할 경우, 耐性인 벼品種들은 GST 활성이 83~142n mole/g FW 범위의 분포를 보였고, 感受性인 벼品種들과 피는 56~77n mole/g FW 분포 범위를 보였다. 따라서 CDNB를 기질로 사용하였을 경우처럼 그 차이가 크지는 않았으나 耐性 벼品種들에서 GST 활성이 다소 높은 경향임을 알 수 있었다. Frear와 Swanson<sup>8)</sup>은 DPE계 除草劑인 acifluorfen에 感受性인 오이나 토마토보다 耐性인 목화, 옥수수, 콩 등에서 GST 활성이 높았다고 함으로써 본 연구의 결과와 일치하였다.

Glutathione 抱合反應<sup>8,9,10,28)</sup>에 의해 異物質인 除草劑는 GST에 의해 식물체내의 glutathione과 결합해서 보다 수용성이고 除草活性이 낮은 화합물로 반응하게 된다. 따라서 GST는 oxyfluorfen에 의하여 그 활성이 유도될 것으로 예상된다. 이 점을 확인하고자 각 식물종을 10일간 육묘하여 oxyfluorfen을  $10^{-7}$ ~ $10^{-4}$  M 농도로 처리하고 光에 노출시킨 후 CDNB를 기질로 하여 분석하였다(그림 6).



**Fig. 6.** Change of glutathione S-transferase(GST) activity in selected plants at 6 hours after oxyfluorfen treatment [GST activity was measured using CDNB as substrate].



**Fig. 7.** Change of glutathione S-transferase(GST) activity on selected rice cultivars to oxyfluorfen at 6 hours after diphenyl ethers and oxadiazon treatment(1 uM).

Oxyfluorfen 처리 후 耐性和 感受性 벼品種들에서 GST는 유도되지 않았을 뿐만 아니라 오히려 oxyfluorfen에 의하여 그 활성이 억제되는 경향이였으며, 그 활성은 耐性和 感受性 벼品種들간에도 차이가 없었다. 그러나 oxyfluorfen 처리 후 피에서는 GST가 다소 유도되는 경향이였으나 oxyfluorfen 농도의 영향은 뚜렷하지 않았다. 따라서 oxyfluorfen 처리 농도에 따른 GST 활성 유도정도를 生理活性 차이의 요인으로 해석하기는 어려울 것으로 사료된다.

DPE계와 oxadiazon 처리 후 GST 활성 변화를 CDNB를 기질로 사용하여 분석한 결과를 그림 7에 나타냈다. 일반적으로 GST 활성은 除草劑에 의하여 억제되는 경향이였으며, oxy-

fluorfen과 bifenox에 대해서는 耐性과 感受性 벼品種間의 活性 차이가 없었으나 acifluorfen에서는 耐性 벼品種에서 GST 活性이 다소 높았다.

DPE계의 除草劑인 acifluorfen의 代謝에는 GST가 중요한 비중을 차지하고 있는 것으로 보아 이의 분포와 농도가 DPE계의 生理活性에 영향을 미친다고 하였으며<sup>9)</sup>, 또한 metolarchlor에 대한 耐性은 GST 活性과 상관이 있었다고 하였다<sup>10)</sup>. Shim 등<sup>35)</sup>은 pretilachlor에 耐性인 옥수수과 벼가 感受性인 피보다 높은 GST 유도능력을 나타내는 것으로 보고하였다. 본 실험에서 GST 活性은 oxyfluorfen에 의하여 유도되지 않았으며 이에 대한 耐性 요인으로 작용하지 않는 것처럼 나타난 점은 oxyfluorfen 자체가 代謝되지 않는다는 보고<sup>29,37)</sup>에서도 짐작되는 바와 같이 glutathione에 의한 oxyfluorfen의 抱合反應이 활발하게 일어나지 않기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 耐性 식물들의 GST 活性이 感受性 식물들보다 유의성있게 높았음을 고려한다면, GST와 oxyfluorfen에 대한 식물의 耐性과의 상관을 배제할 수는 없었다.

### 摘 要

DPE계 除草劑인 oxyfluorfen의 生理活性을 耐性으로 선발되었던 벼 3品種과 感受性 벼 4品種 및 피를 공시하여 oxyfluorfen을 처리 후 抗酸化劑 함량과 GST 活性으로 조사하였다.

1. 식물자체가 보유하는 vitamin C 함량은 耐性 벼品種들이 感受性 벼品種들이나 피보다 많았다. Vitamin E, carotenoid 및 glutathione (GSH, GSSG, total glutathione) 함량은 耐性과 感受性 식물들간에 양적인 차이를 볼 수 없었다.
2. Oxyfluorfen 처리에 따른 vitamin C 함량은 耐性 벼品種 Hawon과 Baru에서 感受性 벼品種들과 피보다 감소가 적었다. Oxyfluorfen 처리 후 vitamin E 및 GSH 함량은 耐性 벼品種들이 感受性 벼品種들이나 피보다 높았다. 그러나 carotenoid 함량은 耐性 벼品種들

이 感受性 벼品種들보다 높았으나, 感受性인 피와는 차이가 없었다. 그리고 GSSG 함량은 耐性과 感受性種들간 차이가 없었다.

3. CDNB 또는 oxyfluorfen을 기질로 사용했을 때 식물 자체가 보유한 GST 活性은 耐性 벼品種들이 感受性 벼品種들이나 피보다 높았다.
4. Oxyfluorfen 처리 후 GST 活性은 벼에서 유도되지 않았으나, 오히려 피에서는 유도되었다. 또한, 벼의 GST 活性은 acifluorfen, bifenox 및 oxadiazon 처리에서도 유도되지 않았다.

### 引 用 文 獻

1. Breaux, E.J., J.E. Patanella and E.F. Sanders. 1987. Chloracetanilide herbicide selectivity ; Analysis of glutathione and homoglutathione in tolerant, susceptible, and safened seedling. J. Agric. Food Chem. 55: 474-478.
2. Coxs, G.S. and D.G. Whitten. 1983. Excites state interactions of protoporphyrin IX and related porphyrins with molecular oxygen in solutions and organized assemblies. In porphyrin photosensitization, D. Kassal. T.J. Dougherty, eds, pp.279-292. Plenum, New York.
3. Dybing, C.D. and H.B. Currier. 1961. Foliar penetration of chemicals. Plant Physiol. 36: 169-174.
4. Edwards, R. and Owen, W.J. 1986. Comparison of glutathione S-transferase of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension cultured cells. Planta 169: 208-215.
5. Evans, J.D., H.L., Cavell, B.D. and Hignett, R.R. 1987. Fomesafen-metabolism as basis for its selectivity in soya. Proceedings of the 1987 British Crop Protection Conference-Weeds, this volume.
6. Finckh, B.F and K.J. Kunert. 1985. Vitamin C and E : An antioxidative system against



- herbicide-induced lipid peroxidation in higher plants. *J. Agric. Food Chem.* 33: 574-577.
7. Flank, J. and H.A. Collin. 1978. Selection of resistance to asulam in oil seed rape, *Abst. 4th Int. Cong. Plant Tissue Cell Cult.*, Calgary, Alberta. 171.
  8. Frear, D.S. and H.R. Swanson. 1973. Metabolism of substituted diphenyl ether herbicides in plants. I. Enzymic cleavage of fluorodifen in peas (*Pisum stivum*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 3: 473-482.
  9. Frear, D.S., H.R. Swanson and E.R. Mansager. 1983. Acifluorfen metabolism in soybean : Diphenyl ether bond cleavage and the formation of homogluthione, cystein and glucose conjugates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 20: 299-310.
  10. Fuerst. E.P., G.P. Irzyk and K.D. Miller. 1993. Partial characterization of glutathione S-transferase isozymes induced by the herbicides safener benoxacor in maize. *Plant Physiol.* 102: 795-802.
  11. Hissin P.J. and R. Hilf. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74: 214-226.
  12. Knox J.P. and A.D. Dodge. 1985. Review article number 7 singlet oxygen and plants. *Phytochemistry.* 24(5): 889-896.
  13. 鞠龍仁・具滋玉・李恩京. 1996. Oxyfluorfen에 대한 耐性 및 感受性 벼品種의 生理活性 機構. I. Callus, 單細胞 및 原形質體 反應. *韓雜草誌.* 16(1):인쇄중.
  14. Kunert, K.J. and P. Boger. 1984. The diphenyl ether herbicide oxyfluorfen : Action of anti-oxidants. *J. Agric. Food chem.* 32: 725-728.
  15. Lambert, R. and P. Böger. 1984. Peroxidative activity of oxyfluorfen with regard to carotenoides in scenedesumus. *J. Agric. Food Chem.* 32: 523-526.
  16. Lambert, R., K.J. Kunert and P. Böger. 1979. On the phytotoxic mode of action of nitrofen. *Pestic. Biochem. Physiol.* 11: 267-274.
  17. Lamoureux, G.L., D.G. Rusness, P. Schroder and H. Rennenberg. 1991 Diphenyl ether herbicide metabolism in a spruce cell suspension culture : The identification of two novel metabolites derived from a glutathione conjugate. *Pestic. Biochem. Physiol.* 39: 91-301.
  18. Lamoureux, G.L., L.E. Stafford and F.S. Tanaka. 1971. Metabolism of 2-chloro-N-isopropylacetanilide (proachlor) in the leaves of corn, sorghum, sugar cane and barley. *J. of Agri. and Food Chem.* 19: 346-350
  19. Law, M.Y., S.A. Charles and B. Halliwell. 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 210 : 899-903.
  20. 李增周. 1992. 光要求型 ジフェニルエーテル系 除草劑の選擇作用 機構に 關する研究. 日本 博士學位 論文 p156.
  21. 二木 銳雄. 1988. 活性酵素の消去: 低分子化合物:アスコルビンとグルタチオン. 蛋白質核酸 酵素 臨時増刊「活性酵素」33: 2973-2978.
  22. 日本ビタミン學會 編. 1989. ビタミンC・ビタミンハンドブック「ビタミン分析法」p.135-144.
  23. 日本ビタミン學會 編. 1989. ビタミンE・ビタミンハンドブック「ビタミン分析法」p.27-35.
  24. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol.* 148: 350-382.
  25. Matringe, M. and R. Scalla. 1988. Studies on the mode of action of acifluorfen -methyl in nonchlorophyllous soybean cells. *Plant Physiol.* 86: 619-622.
  26. Matringe, M., D. Clair and R. Scalla. 1990. Effects of peroxidizing herbicides on pro-

- toporphyrin IX levels in nonchlorophyllous soybean cell culture, *Pestic. Biochem. Physiol.* 36: 300-307.
27. Matsumoto, H., S. Kojima and K. Ishizuka. 1990. Characteristics of herbicidal injury by diphenyl-ether herbicides oxyfluorfen and bifenoxy in *Lamna paucicostata* HEGERM. *Weed Research, Japan* 35(1): 36-43.
  28. Mozer, T.J., D.C. Tiemeier and E.C. Jaworsik. 1983. Purification and characterization of corn glutathione-S transferase. *Biochemistry.* 22: 1068-1072.
  29. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantaum.* 15: 473-497.
  30. Orr, G.L. and F.D. Hess. 1981. Characterization of herbicidal injury by acifluorfen-methyl in excised cucumber(*Cucumis sativus* L.) cotyledons. *Pestic. Biochem. Physiol.* 16: 171-178.
  31. Owen W.J. 1989. In "Herbicides and plant metabolism" p.171-198.
  32. Peter B. 1987. Possible targets for phytotoxic compounds. *J. Pesticide Sic.* 12: 749-757.
  33. Rennenberg, H. 1982. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21: 2771-2781.
  34. Schmidt, A. and K.J. Kunert. 1986. Lipid peroxidation in higher plants. The role of glutathione reductase. *Plant Physiol.* 82: 700-702.
  35. Shim, I.S., K. Usui and K. Ishizuka. 1990. Studies on the selective mechanism of pretilachlor. I. Relation of glutathione content and glutathione S-transferase activity to pretilachlor selectivity in several plant species. *Weed Research, Japan.* 35(1): 25-35.
  36. Shimabukure, R.H., G.H. Lamoureux and D.S. Frear. 1978. Glutathione conjugation : A mechanism of herbicide detoxication and selectivity in plants, in "chemistry and action of herbicide antidotes"(F.M. Pallos and J.E. Casida, Eds.), p 133. Academic press, New York.
  37. Vanstone, D.E. and E.H. Stobbe. 1978. Root uptake, translocation, and metabolism of nitrofluorfen and oxyfluorfen by fababeans(*Vicia faba*) and green foxtail(*Setaria viridis*). *Weed Sci.* 26: 89-392.
  38. William H.K. and S.O. Duke. 1985. Effects of acifluorfen on endogenous antioxidants and protective enzymes in cucumber(*Cucumis sativus* L.). cotyledons. *Plant Physiol.* 79: 862-866.