

Acifluorfen의 莖葉處理가 大豆 및 바랭이의 葉組織에서 Peroxidase 活性에 미치는 영향

金 泰 完 · 姜 炳 華

Effects of the Foliar Applied Acifluorfen on the Peroxidase Activity in Leaf Tissue of Soybean (*Glycine max* Merr.) and Crabgrass (*Digitaria adscendens* (L.) Scopol.)

Kim, Tae Wan and Kang, Byeung Hoa

Abstracts

This study was carried out to investigate the specific activity of peroxidase(POD) in conjunction with the phytotoxic effect of the tolerant soybean(*Glycine max* Merr.) and the susceptible crabgrass(*Digitaria adscendens*(L.) Scopol.) to acifluorfen.

The POD activity increased during the growth of soybean and crabgrass seedlings. But after the foliar application of acifluorfen, the POD activity in the treated leaves was considerably higher than in controlled leaves, suggesting that soybean had higher tolerance to acifluorfen with growth. All the treated soybeans recovered from herbicidal injury in 14 days after treatment, while all the treated crabgrasses were dead with extreme necrosis and leaf burning. It was measured that the POD activity of crabgrass increased abruptly in 1 to 2 days after treatment and then significantly decreased in 5 days.

Key words; acifluorfen, peroxidase activity, soybean, crabgrass.

緒 言

acifluorfen은 活性化에 光이 필요한 Diphenyl ether 제(DPE) 除草劑로서, ^{3, 5, 10, 12, 15, 16, 18)} 移行성이 1% 미만인 接觸形 除草劑로 알려져 있다. ^{10, 17, 19)} acifluorfen은 植物體의 phenol 代謝에 관여하여, aromatic amino acid에서 유도된 phenol 化合物 pterocarpan, terpenoid 및 phytoalexin 生成을 증가시킨다고 한다. ²¹⁾

특히 Kömives 등⁹⁾은 大豆에서 acifluorfen 處理에 의

해 glyceollin I, II, III 및 glycefoluran 과 같은 phytoalexin 이 증가하였다고 하면서, 이와 관련하여 lipid peroxidation, 세포막 투과성, ethylene 生成 및 phenylalanine amoniolyase(PAL)²⁾의 活性도 증가한다고 하였다.

일반적으로 大豆는 acifluorfen 에 耐性を 갖고 있는 것으로 알려져 있으며, ²⁴⁾ 완두에서도 acifluorfen 에 대한 耐성이 報告된 바 있다. ²²⁾ 한편, Duke 등⁴⁾은 오이에 acifluorfen 을 處理한 結果 mitochondria 에서 superoxide radical 과 hydrogen peroxide 가 상당히 증가

하였다고 하면서, acifluorfen의 作用에 mitochondria가 관련되어 있다고 報告하였다.

植物은 機械的 傷處를 받거나 病原菌에 感染되면, ethylene과 lignin 및 phytoalexin 形成에 関여하는 peroxidase^{7,8,10} 및 PAL의 活性이 증가하며,^{7,9} 이러한 일련의 代謝作用이 植物의 抵抗作用으로 알려져 왔다.

本 試驗은 除草劑 acifluorfen에 대해 耐性인 大豆와 感受性인 바랭이의 葉에서 的 Peroxidase 活性을 測定하여, acifluorfen이 植物體의 secondary reaction에 관련되는 가와 그 程度를 檢討함으로써 체계적 雜草防 除를 위한 기초자료를 提供코자 遂行하였다.

材料 및 方法

1986年 6月 15日 장엽콩을 76×15×17cm 사각 pot에 12×6cm의 栽植距離로 二粒點播하였다. Rohm & Haas社에서 제공받은 acifluorfen (Blazer 20.4 EC; 5-[2-chloro-4(trifluoromethyl) phenoxy]-2-nitrobenzoic acid)을 大豆 1.5 復葉期인 1986年 7月 2日과 2.5 復葉期인 7月 8日 各各 306g.a.i./ha 및 612g.a.i./ha로 藥量을 조절하여 午前 10時에 處理하였다. 분무기는 日本 FURUPLA社의 小形 加壓式 噴霧器를 使用하였고 處理물량을 1,000l/ha로 同一하게 하였다. 試驗用 pot는 高麗大學校 農科大學 實驗포장에 완전임의배치 3反復으로 하였고 供試土壤은 식양토였다. 또한 바랭이의 發生을 위해 前年度 바랭이가 多發生했던 토양을 혼합하였다. 肥料는 全量 肥基(N-P₂O₅-K₂O=3-6-8kg/ha)로 하였다. 表 1은 acifluorfen의 處理藥量과 莖葉處理時 大豆와 바랭이의 生育程度를 나타낸 것이다. 試料는 處理直前과 處理後 1~5日 동안 24時間 간격으로 1.5 復葉處理區에서는 제 1,2 復葉을, 2.5 復葉處理區에서는 제 2,3 復葉을 採取하여 分析時까지 -20°C에서 완전밀봉한 後 냉동보관하였다. 酵素추출은 採取 葉 生體重의 5배의 0.1M Na₂HPO₄-Na₂H₂PO₄ buffer (pH 7.2)를 添加하여 4°C에서 유발을 使用 마쇄한 後 냉동 원심분리(12,000×g, 4°C, 30分)하여 상등액을 取하였다. 이 상등액을 1:10으로 稀釋한 後 30°C 溫湯水槽에 定置시킨 peroxidase assay mixture(guaiacol 0.5ml, 1% H₂O₂ 10ml, 0.1M acetate buffer pH 5.2 235ml) 5ml에 0.1ml씩 혼합하고 vortexing하면서 30초간 반응시킨 後 500nm에서 60초동안의 흡광도 차이를 反復當 6측정하여 다음과 같이 계산하였다.⁶⁾

$$\text{specific activity} = \frac{\Delta O.D. \times 1000}{\text{protein(mg)}}$$

protein 含量은 증류수 0.8ml와 추출희석액 0.2ml

Table 1. The treatment time and dosage of acifluorfen in soybean and crabgrass.

species	leaf stage	Dosage	
		acifluorfen g.a.i./ha	Blazer 20.4 EC l/ha
soybean	control	—	—
	1.5	306	1.50
	1.5	612	3.00
	2.5	306	1.50
	2.5	612	3.00
crabgrass	control	—	—
	1.0	306	1.50
	1.0	612	3.00

를 혼합한 後 반응액 2ml 섞어 10分間 放置한 다음 phenol reagent(phenol : H₂O=1 : 9) 1ml를 혼합 60°C 溫湯水槽에 10分間 배워 汾水에 식힌 다음 595nm에서 分析하였다.¹⁴⁾ 반응액은 500ml 증류수에 NaOH 2g과 Na₂CO₃ 10g을 혼합한 용액, 500ml 증류수에 CuSO₄·5H₂O 5g을 혼합한 용액, 그리고 500ml 증류수에 Sodium tartrate 10g을 혼합한 용액을 50 : 0.5 : 0.5 비율로 혼합하여 使用하였다.

結果 및 考察

1.5 復葉期에 處理된 제 1 復葉의 peroxidase 活性은 處理 1日後에는 對照區와 거의 차이가 없었고 오히려 高藥量 處理인 612g.a.i./ha 處理葉의 活性이 低藥量 處理인 306g.a.i./ha 處理葉보다 다소 낮았다. 그러나 處理 2日後부터 POD의 活性이 對照區보다 현저히 증가하기 시작하여 處理 5日後까지 계속 증가하면서 큰 차이를 나타내었고, 處理 14日後에는 處理葉의 活性이 對照區와 비교적 비슷하였다(그림 1). 한편 新生葉인 제 2 復葉의 POD 活性 변화를 보면 612g.a.i./ha 處理葉은 處理 5日後까지 對照區보다 6~9배 정도 높은 活性을 보이면서 증가를 계속하였고 處理 14日後에도 감소하기는 하지만 상당히 높은 活性을 나타낸 반면, 306g.a.i./ha 處理葉은 處理 3日後까지 活性이 증가하였다가 以後 감소하여 정상으로 回復되었다(그림 2).

그림 3과 4는 大豆 2.5 復葉期에 處理된 第 2 復葉과 제 3 復葉에서의 POD 活性 변화를 나타낸 것이다. 處理葉의 POD 活性은 同一藥量處理區內에서는 新生葉인 제 3 復葉의 活性이 낮았으며, 또한 1.5 復葉處理葉 보다는 대체로 活性이 떨어졌다. 제 2 復葉과 제 3 復葉은 모두 處理 14日後 거의 정상으로 回復되었다. 제

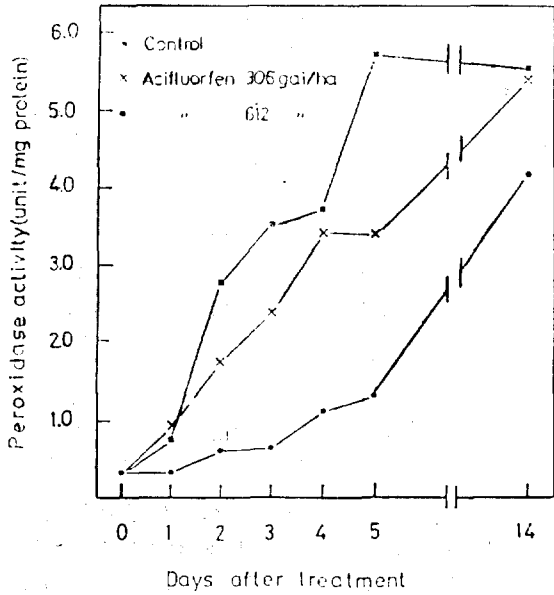


Fig. 1. The changes of peroxidase activities of the 1st trifoliates after treated with acifluorfen at the 1.5 trifoliolate stage in soybean.

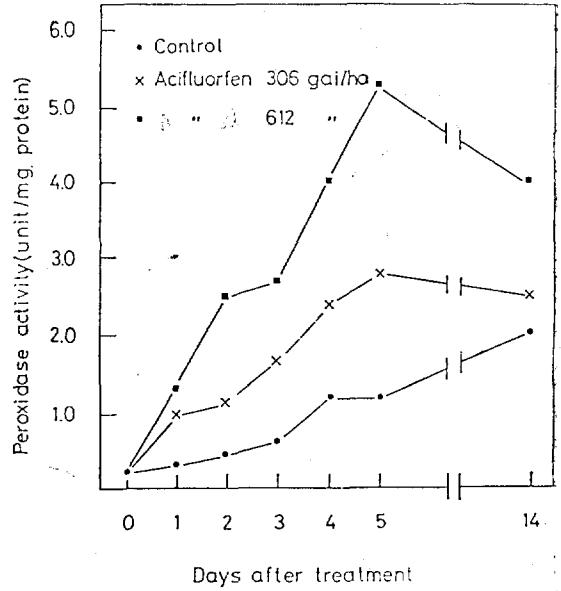


Fig. 3. The changes of peroxidase activities of the 2nd trifoliates after treated with acifluorfen at the 2.5 trifoliolate stage in soybean.

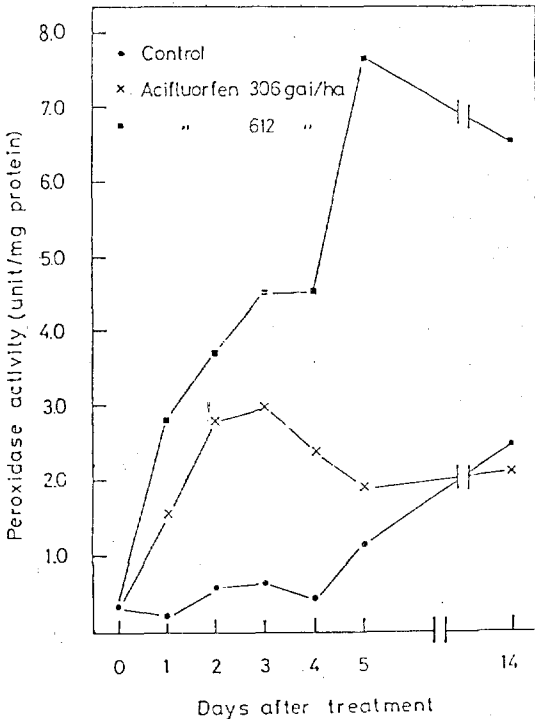


Fig. 2. The changes of peroxidase activities of the 2nd trifoliates after treated with acifluorfen at the 1.5 trifoliolate stage in soybean.

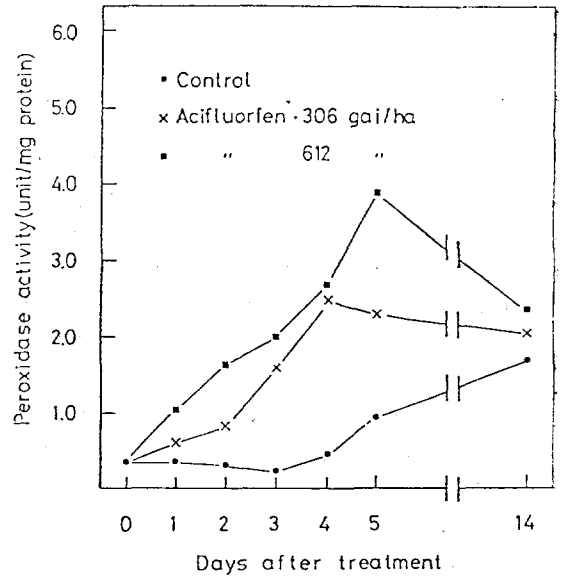


Fig. 4. The changes of peroxidase activities of the 3rd trifoliates after treated with acifluorfen at the 2.5 trifoliolate stage in soybean.

2 復葉의 경우 1.5 復葉期에 處理한 제 2 復葉보다 POD 活性이 낮았으며, 이는 處理時期가 상대적으로 어린 1.5 復葉期에 處理되어 除草劑에 의한 藥害를 더 심하

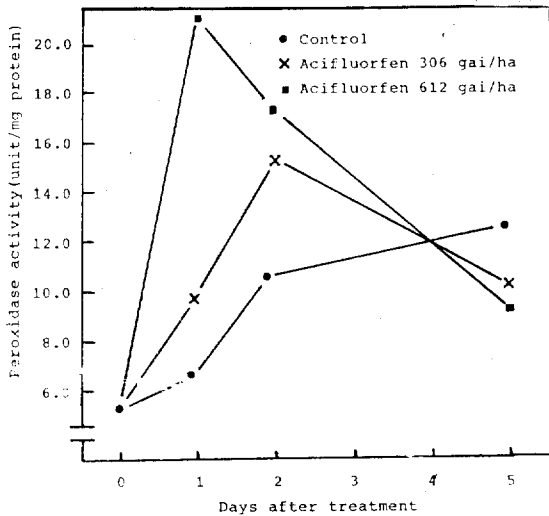


Fig. 5. The changes of peroxidase activities of the 1st leaves after treated with Acifluorfen at the 1st leaf stage in *Digitaria adscendens*.

게 받았음을 나타낸다.

그림 5에서 보는 바와 같이, 바랭이는 處理 1日後부터 현저하게 증가하였으며, 612g.a.i./ha 處理葉은 處理 1日後, 306g.a.i./ha 處理葉은 處理 2日後 최대 活性을 보였으나, 以後 급격히 감소하여 處理 5日後에는 對照區보다 오히려 活性이 떨어졌다. 이는 바랭이가 acifluorfen의 藥害로부터 회복되었다기 보다는 극심한 necrosis와 함께 고사함으로써 생리적 대사작용이 정지했기 때문으로 생각되었다.

Guh 등⁶⁾은 acifluorfen 處理後 新生葉에서 가벼운 주그러짐, 갈라짐, 피사현상이 發生하나 곧 회복된다고 하였으나, Wax²³⁾는 大豆 William 品種에 acifluorfen을 1.12kg/ha로 發生後에 處理하였을 때 藥害가 유발되지 않았다고 하였다.

本試驗에서는 大豆의 생육이 진전될수록 acifluorfen에 대한 藥害가 경감되었으며, 이는 大豆가 성장과 함께 耐性이 증가한 결과로 사료되었다. 또한 leaf burning 현상과 necrotic spot이 나타나는 것은 peroxidase가 NADH와 O₂로부터 H₂O₂를 생성시킨後, 2分子의 aromatic alcohol로부터 H 1分子씩을 유리하여 H₂O₂와 결합시킴으로써 H₂O 2分子가 만들어지는 反應을 촉매하여, 植物의 lignification에 參與함으로써 일어나는 것으로 思料되었다.

한편, 바랭이가 acifluorfen에 민감하게 작용하여 處理 5日以内に 모두 枯死하는 것은 耐性機作이 없다가 보다는 peroxidase이 活力이 過度하여, 體内に 生成된 H₂O₂가 基質인 aromatic alcohol의 부족으로 集積되고, 또한 급격하게 lignification이 發生함으로써 일어

난 結果로 思料되었다. 또한 바랭이와 大豆의 peroxidase 活力이 초기에 차이를 보이는 것은 종간의 생리화학적 특성차이라고 생각되나, 상대적 변화에 있어 바랭이가 월등하게 빠르게 증가하는 것으로 보아 大豆는 acifluorfen 處理後 4시간 以内に 50% 이상 다른 화합물로 대사되었지만, *Datura stramonium*, *Abutilon theophrasti* 및 *Cassia obtusifolia*는 거의 대사하지 않았다는 Lambert & Basler의 보고와 유관하였다.¹⁰⁾

最近에는 acifluorfen에 대한 解毒作用으로 glutathione의 conjugation에 관한 報告^{11,12,20,24)}가 있었으며, shimabukuro 등²⁰⁾은 acifluorfen이 S-cysteine 化合物이 N-malonyl-cysteine 化合物로 代謝함으로써 毒性이 없어지게 된다고 하였다. 이러한 作用들은 peroxidase의 活性에 의한 作物의 除草劑 안전성연구에서의 몇가지 문제점들을 해결할 수 있는 防法으로 摸索될 수 있으리라 思料된다.

또한, peroxidase 作用의 基質인 aromatic alcohol의 生成過程인 Shikimate pathway의 선구물질로 알려진 phenylalanine 및 tyrosine의 分解에 作用하는 phenylalanine ammonia-lyase(PAL)와 tyrosine ammonia-lyase(TAL)의 活性 연구도 acifluorfen의 선택성 규명에 필요하리라 생각된다.

本試驗中 acifluorfen 處理後 5日以内に 날씨가 쾌청하여 acifluorfen의 약해경감은 없었으리라 思料된다.¹⁰⁾

摘 要

acifluorfen이 大豆와 바랭이의 莖葉에서 peroxidase의 活性에 어떻게 影響을 미치는가를 究明하여 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Peroxidase 活性은 處理濃度가 높을수록 높았으며 處理時期가 늦을수록 낮았다.
2. 1.5 復葉期에 處理했을 때는 新生葉인 2 復葉의 活性이 높았으나, 2.5 復葉期에 處理했을 경우는 新生葉인 3 復葉의 活性이 오히려 낮았다.
3. 1.5 復葉 處理의 新生葉인 2 復葉에서의 peroxidase 活性이 2.5 復葉 處理의 2 復葉보다 높았다.
4. 모든 處理葉이 necrosis와 leaf burning 현상이 나타났지만, 處理 14日 後에는 거의 정상으로 回復되었다.
5. 바랭이는 處理 1~2日後 peroxidase 活性이 현저하게 증가하였고, 5日 後에는 급격히 감소하였다. 이는 바랭이가 acifluorfen 處理後 3~7日以内に 모두 枯死하였기 때문이었다.

References

1. Banks, S.W. and P.M., Dewick (1982) : (-)-Pisatin, an induced pterocarpan metabolite of abnormal configuration from *Pisum sativum*, *Phytochemistry*, 21, 1605~1608.
2. Birecka, H. and J., Catalfamo (1976) : Cell isoperoxidase in sweet potato plants in relation to mechanical injury and ethylene, *Plant Physiol.*, 57, 74~79.
3. Bugg, M.W., J. Whitmarsh, C.E. Rieck and W.S., Cohen (1980) : Inhibition of photosynthetic electron transport by diphenylether herbicides, *Plant Physiol.*, 65, 47~50.
4. Duke, S.O., K.C. Vaughn and R.L., Meeusen (1984) : Mitochondrial involvement in the mode of action of acifluorfen, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21(3), 368~376.
5. Fadayomi, O. and G.F., Warren (1976) : The light requirement for herbicidal activity of diphenyl ethers, *Weed Sci.*, 24, 598~600.
6. Guh, J.O., S.M. Huh and D.K., Kim (1984) : Improvement of herbicide use in crop production. V. Compatible use of herbicide Acifluorfen at different crop stages in soybean(*Glycine max* Merr.) fields. *Jonnam Univ. Thesis(Ag. & Fr.)*, 29, 1~6.
7. Hadwiger, L.A., S.L. Hess and S., Broembsen (1970) : Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase activity and phytoalexin production, *Phytopathology*, 60, 332~336.
8. Iwata, M., Y. Suzuki, T. Watanabe, S. Mase and Y., Sekizawa (1980) : Effect of probennazole on the activities of enzymes related to the resistant reaction in rice plant, *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 46, 297~306.
9. Kömives, T. and J.E., Casida (1982) : Diphenyl ether herbicides: effects of acifluorfen on phenylpropanoid biosynthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in spinach, *Pest. Biochem. Physiol.*, 18, 191~196.
10. Lambert, W.D. and E., Basler (1983) : Absorption, translocation and metabolism of acifluorfen in weed and crop plants. In abstracts, 1983. Meeting of the Weed Sci. Soc. Am., 82~93.
11. Lamoureux, G.L. and D.S., Frear (1979) : Pesticide metabolism in higher plants, in vitro enzyme studies, in *Xenobiotic Metabolism, In Vitro Methods*, Paulson, G.D., Frear, D.S., and Marks, E.P., Eds., ACS Symp. Ser. 97, American Chemical Society, Washington, D.C., 77.
12. _____ and D.G., Rusness (1983) : Malonylcysteine conjugates as end-products of glutathione conjugate metabolism in plants, in *IUPAC Pesticide Chemistry: Humane Welfare and the Environment*, Miyamoto, J., Ed., Pergamon Press, New York, 295.
13. Leong, T.Y., and Briggs, W.R. (1981) : Evidence from studies with acifluorfen for participation of a flavin-cytochrome complex in blue light photoreception for phototropism of oat coleoptiles, *Plant Physiol.*, 70, 875~881.
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J., Padall (1951) : Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
15. Matsunaka, S. (1961) : Acceptor of light energy in photoactivation of diphenylether herbicides, *J. Agric. Food Chem.*, 17, 171~175.
16. Moreland, D.E., W.J. Blackmon, H.G. Todd and F.S., Fammer (1970) : Effects of diphenylether herbicides on reaction of mitochondria and chloroplasts, *Weed Sci.*, 18, 635~642.
17. Orr, G.L. and F.D., Hess (1982) : Mechanism of the diphenylether herbicide acifluorfen-methyl in excised cucumber(*Cucumis sativus* L.) cotyledons, *Plant Physiol.*, 69, 502~507.
18. Park, W.M., Y.S. Lee and S.H., Park (1985) : Peroxidase activity in leaf tissue of rice infected by *Puricularia oryzae*, *Kor. J. Plant Pathol.*, 1(3), 178~183.
19. Ritter, R.L. and H.D., Coble (1981) : Penetration, translocation, and metabolism of acifluorfen in soybean(*Glycine max* L.), common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*), and common cocklebur(*Xanimum pennsylvanicum*), *Weed Sci.*, 29, 474~480.
20. Shimabukuro, R.H., Lamoureux, G.L. and D.S., Frear (1982) : Pesticide metabolism in higher plants: reaction and mechanisms, in *Biodegradation of Pesticides*, Matsumura, F. and Krishna

- Murti, C.R. Eds., Plenum Press, New York. p. 21.
21. Suzuki, T., I. Holen and J.E., Casida (1981) : Diphenyl ether herbicides remarkably elevate the content in *Spinacia oleracea* of (E)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethyl-2-propenamide, J. Agric. Food Chem., 29, 992~995.
22. Teasdale, J.R. and J.R., Frank (1983) : Tolerance of peas to acifluorfen applied preemergence. In Abstracts, 1983 Meeting of the Weed Sci. Soc. Am. Vol. 32 No. 12. 3177.
23. Wax, L.M. (1977) : Evaluation of herbicides in soybeans, 1976. Index outline for research reports.
24. Yih, R.Y. (1980) : Mode of action of blazer-A progress report, Herbicide and Plant Growth Regulator Memorandum No. 80~176.