Glufosinate-ammonium에 對한 水稻(*Oryza sativa* L.)品種間 反應

洪錫英* · 金吉雄* · 申東賢*

Responses of Rice Cultivars to Glufosinate-ammonium

Hong, S.Y*., K.U. Kim*, and D.H. Shin*

ABSTRACT

This study was conducted to determine physiological responses rice cultivars to glufosinate-ammonium. Changes of total protein content, protein population, glutamine synthetase activity, accumulated ammonia content and free amino acid composition were examined in both tolerant and susceptible rice cultivars. Tamjinbyeo and Fukei 126 showed relatively tolerant response to glufosinate-ammonium while Namyeongbyeo, Palgongbyeo and Youngdugbyeo were susceptible to it. Total protein content of two tolerant cultivars was 93.2% of the untreated control in average but three susceptible cultivars showed 76.5% of the untreated control in average, showing 16.7% difference. Protein profiles of the tolerant cultivars seemed to be not affected by glufosinate-ammonium treatment. However, in susceptible cultivar like Namyeongbyeo, 10ppm of glufosinate-ammonium application resulted in decrease of band density or disapperance of spot density in near 20kD and in between 45kD and 66kD on 2D-PAGE. Glutamine synthetase activity in susceptible cultivars was markedly inhibited by glufosinate-ammonium treatment, accompanying remarkable increase of ammonia content by three times greater than tolerant cultivars, and markedly increase of glutamic acid, showing 430% of the untreated control.

Key words : Rice, glufosinate-ammonium, glutamine synthetase

緖 言

一般的으로 除草劑에 對한 植物體의 反應은 感受性, 耐性, 抵抗性 等으로 구분되는데, 農業的으로 사용토록 推薦된 除草劑 量에 敏感한 反應을 보여 잘 防除되는 것을 感受性이라 하고, 그 중 일부가 反應을 보이지 않고 生存할 수 있는 內的能力을 지닌 것을 耐性이라 하며, 처음에는 敏感한 反應을 보이다가 連續해서 處理할 境遇 더 이상 防除되지 않고 살아남는 것을 抵抗性으로 定義하고 있다.[1,25]

抵抗性으로 選拔되지 않은 植物體의 生理學적인 特性에 起因한 自然的인 耐性 또는 抵抗性은 '進化된 抵抗性(evolved resistance)'과는 뚜렷이 區分되어야 한다. 이와 같이, 抵抗性의 槪念은 反應의 連續性때문에 定立이 힘들지만 除草劑 抵抗性과 耐性의 植物은 장차 除草劑의 作用機構나 植物의 生化學 過程 등 植物學的 硏究에서 材料植物로 쓰일 수 있고 새로운 除草劑의 選拔이나 遺傳理論 및 反應分野에서의 또 다른 硏究의 source로 供與될 價値를 갖는다.

Glufosinate-ammonium [ammonium-DL-homoalanin-4-yl(methyl) phosphinate]는 非選擇性, 莖葉處理型 除草劑로 一年生 및 永年生 禾本科 및 廣葉에 폭넓게 利用되고 있다[13,16,27]. 또한 土壤微生物에 의해 迅速히 分解되기 때문에 土壤中에서는 除草活性이 거의 없다. 따라서 土

* 慶北大學校 農科大學 Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea.

壞殘留의 念慮가 거의 없는 편이다.

高等植物에서 glufosinate-ammonium은, 암모니아의 同化, 貯藏, 移動과 主要 代謝産物의 合成에서 重要한 役割을 하고 inorganic nitrogen이 organic form으로 轉換되는데 關聯되는 첫번째 酵素인 glutamine synthetase[L-glutamate : ammonia ligase(ADP-forming)EC 6.3.1.2]를 非競爭的으로 沮害하는 것으로 알려져 있다[18,19,20]. 즉, glufosinate가 glutamate binding site에 競爭的으로 binding하여 連續的인 phosphorylation을 招來해 ammonia를 受容해 各種 아미노산 및 核酸의 始原體가 될 glutamine의 生成過程을 막아 그 結果로 體內에 암모니아가 급속히 蓄積된다.[30] 高等植物에서 glufosinate-ammonium 處理 後, glutamine synthetase 沮害의 結果로 生成된 암모니아는 植物體에 有害하고[21] 細胞膜 浸透力과 關聯된 칼륨이온 濃度를 增加시켜[12] 잎을 壞死시킨다고 한다. 따라서, amide 轉移反應에 필요한 glutamine의 不足으로 永年生雜草種의 根莖과 地下部 器官으로부터 줄기의 再生長이 沮害된다. 이와 같은 植物體內의 암모니아 蓄積이 除草活性의 主要要因으로 推定되고 있으나, 아직 確實히 斷定되어 있지는 않다. Kolodziej[14]은 glufosinate-ammonium 莖葉處理後 *Sinapis alba*의 뿌리에서 蛋白質 含量, 總 窒素量, 水溶性 炭水化物의 含量이 減少한다고 報告한 바 있고, 한편 Suwanwong 等[27]은 glufosinate-ammonium 耐性 당근 細胞의 懸濁培養을 통해 glufosinate-ammonium 處理에 의해 glutamine synthetase의 活性이 沮害되고 基質인 암모니아와 glutamic acid의 含量이 크게 增加하며 反應産物인 glutamine의 含量이 크게 減少한다고 報告하였다. 이 밖에도 glutamine synthetase 沮害에 대한 報告[4,18,29]는 여러 편 있으나 glufosinate-ammonium 處理에 따른 蛋白質 패턴의 變化에 대한 報告는 없는 實情이다.

Glutamine synthetase는 一般的으로 高等植物의 綠葉에서 2개의 同位酵素의 形態로 存在하는데 細胞質과 葉綠體에 位置하고 各各 GS_1과 GS_2로 나타낸다. 이들은 各各 獨立的으로 核內의 遺傳子에 의해 code되고 GS_2가 43-45 kD로 37-43 kD인 GS_1보다 약간 더 크고[8,9,10,17,20], 共히 glufosinate-ammonium에 의해 沮害된다고 報告되었다.

Glufosinate-ammonium은 非選擇性 除草劑이지만 作用機作이 같은 微生物農藥 bialaphos에 대한 抵抗性 遺傳子가 최근 몇몇 微生物에서 分離되었고[5,6,22,28], 당근과 알팔파의 경우 glutamine synthetase의 subunit를 code하는 遺傳子發現의 增幅이 耐性을 부여하는 것으로 밝혀져 있다[7,27,29]. 만약 水稻에서 防除範圍가 넓고 環境에 안전한 glufosinate-ammonium에 대한 耐性 source를 探索·分離하여, 水稻와 같이 形質轉換 體系가 確立된 主要作物에 다시 넣을 수 있다면 效用價値가 매우 높을 것으로 思料된다.

이와 같이, glufosinate-ammonium의 吸收와 代謝, glutamine synthetase 活性, 암모니아 蓄積, 體內의 遊離아미노산의 水準에 關한 報告는 있지만 種內, 특히 遺傳的 背景이 많이 알려진 水稻의 品種間 變異에 대해서는 報告된 바가 없다.

따라서, 本 試驗에서는 glufosinate-amonium에 대한 水稻의 品種間의 反應의 差異를 究明하고자 水溶性 蛋白質 含量, 蛋白質패턴의 變化, glutamine synthetase의 活性, 蓄積된 암모니아 含量, 遊離 아미노산 組成變化를 調査하였다.

材料 및 方法

本 試驗에 使用된 水稻(*Oryza sativa* L.)品種은 嶺南作物試驗場으로부터 分讓받았으며, 除草劑 glufosinate-ammonium은 市販되는 바스타液劑(18%)를 使用하였다.

試驗 1. Glufosinate-ammonium에 對한 水稻 品種間 反應

탐진벼 外 112 品種을 對象으로 播種 前 1%의 sodium hypochlorite 溶液으로 30分 殺菌하고 蒸溜水로 3回 洗滌한 後 30℃로 維持되는 恒溫器에서 2日間 催芽시켰다. 이들 催芽된 種子를 直徑 9cm인 petri dish에 各各 15粒씩 置床하고 glufosinate-ammonium 10ppm을 20ml씩 넣어 30℃로 維持되는 恒溫器에서 暗狀態로 培養하였다. 處理 後 5日째 新鞘의 길이를 調査하여 glufosinate-ammonium에 對한 耐性과 感受性 品種을 選拔하였다.

試驗 2. Glufosinate-ammonium이 蛋白質 含量과 패턴에 미치는 影響

1) 總 水溶性 蛋白質 含量의 測定

生體量 1g을 液體窒素를 이용하여 막자사발에서 磨碎하여 50mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2, 0.5mM Na_2EDTA, 0.01%(w/v) mercaptoethanol) 1ml을 加해 抽出한 後 13,000rpm에서 30分間 遠心分離하였다. 上澄液 中 100μl를 취해 Bradford[2]의 方法으로 溶液內의 蛋白質 含量을 測定하였다. 標準線은 bovine serum albumin (BSA)를 使用하여 求하였으며 이를 基準으로 蛋白質 含量을 算出하였다.

2) 蛋白質 패턴의 變化

① 1次元 電氣泳動

生體量 100mg을 4℃로 維持되는 막자사발에서 磨碎한 後 1mg의 Tris-HCl 緩衝液(pH 6.8, 5% mercaptoethanol, 4% glycerol, 3% SDS)를 加하여 eppendorf tube에 回收하여 4℃ 冷藏庫에 30分間 定置한 後 13,000rpm에서 20分間 遠心分離하여 얻은 上澄液을 試料로 하였고, Laemmli[15]의 方法을 變形하여 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 遂行하였다. Separating gel로는 13% polyacrylamide를 利用하였고 stacking gel로는 3.9% polyacrylamide를 利用하였으며, electrode buffer로는 Tris-HCl 緩衝液(pH 8.3, 0.195 M glycine, 0.1% SDS)을 利用하였다. 試料는 各各 30μl씩 load하여, stacking gel에서는 20mA, separating gel에서는 40mA로 電氣泳動을 遂行하였다. 電氣泳動 後, 固定液(50%(v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid, 40%(v/v) deionized water)에서 1時間, 染色液(0.05%(w/v) Coomassie brilliant blue, 50%(v/v) methanol, 10%(v/v) acetic acid, 40%(v/v) deionized water)에서 5時間 染色 後 脫色液(5% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid, 88%(v/v) deionized water)에서 脫色하였다.

② 2次元 電氣泳動

2次元 電氣泳動에 使用하기 위한 試料는 TCA 沈澱法을 利用하였다. 즉, 生體量 100mg의 試料를 液體窒素를 이용하여 磨碎하여 500μl TCA acetone(10% TCA+0.07% meracptoethanol in acetone)을 加해 잘 懸濁한 後 -20℃에서 15分間 遠心分離하였다. 上澄液을 除去한 後 500μl cold acetone(0.07% mercaptoethanol in acetone)을 加해 잘 懸濁하여 15,000rpm에서 5分間 遠心分離하였다. 上澄液을 除去한 後 pellet을 減壓下에서 乾燥시켜 sample 緩衝液(lysis buffer : 8.5M urea, ampoline 1.6% pH 5-8+0.4% pH 3.5-10, 5% mercaptoethanol, 3% NP-40)으로 抽出한 다음 10,000rpm에서 5分間 遠心分離하여 上澄液을 回收하여 蛋白質패턴을 檢定키 위한 試料로 利用하였다. 2次元 電氣泳動은 O'Farrell[23]의 方法을 基礎로 하여 遂行하였다. 1次元은 non-equilibrium pH gradient electrophoresis로 4.8% polyacrylamide를 包含한 tube gel에서 陽極에 10mM H_3PO_4, 陰極에 20mM NaOH를 채우고, 200V에서 15分, 300V에서 15分, 400V에서 30分間 prerun시켜 pH 勾配를 이룬 後 400V에서 12時間, 800V에서 1時間 電氣泳動시켰다. Tube에서 빼낸 gel을 0.0625 M Tris-HCl 緩衝液(pH 6.8, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 2.3% SDS)으로 中和시켜 利用하였다. 2次元은 SDS-PAGE로 分子量別로 展開한 것으로 앞의 1次元 電氣泳動과 같은 方法으로 遂行하였다.

電氣泳動 後 gel을 洗淨液 1(50% ethanol, 10% acetic acid(glacial), 40% deionized water)과 洗淨液 2(10% ethanol, 5% acetic acid(glacial), 85% deionized water)에 各各 30分, 20分間 담그어 震湯한 후 Nakaraitest 社의 Silbest-Stain kit로 銀染色 하였다.

試驗 3. Glutamine synthetase 活性에 미치는 影響

1) Glutamine synthetase 活性 測定

Glutamine synthetase의 抽出 및 活性測定은 O'Neal과 Joy[24]의 方法을 따랐다. 耐性과 感受性으로 選拔된 品種의 處理區와 無處理區 幼植物의 生體量 2g을 4℃로 維持되는 막자사발에서 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2, 0.5mM Na_2 EDTA, 0.01%(v/v) mercaptoethanol) 4ml을 加하며 磨碎하여 13,000rpm에서 20分間 遠心分離하여 얻은 上澄液을 粗酵素液으로 사용하였다. Glutamine synthetase 活性 測定은 다음과 같이 遂行하였다. 0.6ml 0.25M imidazole-HCl 緩衝液(pH 7.0), 0.4ml 0.3 M sodium glutamate, 0.4ml 30mM ATP, 0.2ml 0.5 M magnesium

sulfate가 混合된 溶液에 1.2ml의 酵素液을 넣고, 30℃ 恒溫水槽에서 5分間 活性化 시킨 後, 0.2ml의 hydroxylamine 溶液(1 M NH_2OH : 1 M NAOH=1 : 12)을 加해 反應을 開始하였다. 이때 hydroxylamine 溶液을 加하지 않은 것을 blank로 利用하였다. 15分 後에 0.8ml의 反應停止液(10% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ in 0.2 M HCl : 24% trichloroacetic acid : 18% HCl=1 : 1 : 1)을 加해 反應을 中止시켰다. 이 反應混合液을 3,000 rpm에서 10分間 遠心分離하여 上澄液을 취하고 反應 結果 生成된 glutamyl hydroxamate (GHA)의 양을 測定하였다. 5mM GHA를 0-0.6 ml의 範圍에서 glutamine synthetase 測定과 同一한 方法으로 反應시켜 540nm에서 吸光度를 測定하여 標準線을 얻었고 이를 基準으로 glutamine synthetase의 活性程度를 究明하였고, μmol GHA/mg protein/min로 表示하였다.

2) 암모니아 含量 測定

生體量 0.5g에 1.5ml의 10% TCA를 加해 막자사발에서 磨碎하여 12,000rpm에서 30分間 遠心分離하여 上澄液을 암모니아 含量 測定의 試料로 使用하였다. 암모니아 含量 測定은 Chen과 Ching[3]의 방법을 變形하여 實施하였다. 즉, 試料液 0.8ml에 0.25 M phenol 溶液 0.8ml과 sodium nitroprusside 溶液 0.8ml을 加한 後 1.6 ml의 發色溶液(sodium hypochlorite solution : alkaline reagent=1 : 4)을 攪伴하며 서서히 넣어준 다음 反應混合液을 37℃ 恒溫水槽에서 20分間 培養하면서 發色시켜 560nm에서 吸光度를 測定하였다. 標準曲線은 ammonium sulfate를 使用하여 위와 同一한 方法으로 얻었으며 이를 基準으로 암모니아 含量을 算出하였다.

3) 遊離 아미노산 組成 分析

아미노산의 抽出, 前處理 및 ortho-phthaldehyde(OPA)誘導體 製造는, 試料에 들어있는 遊離 아미노산을 ion exchange 칼럼으로 分離 後 OPA (ortho-phthaldehyde) reagent와 反應시켜, 아미노산이 detector에 들어가기 전에 溶媒에 反應試藥을 넣어주어 on-line으로 誘導體를 만들어 檢出하는 post column 法으로 HPLC를 施行하여 分離, 定量하였다. 生體 0.5g을 液體窒素 中에서 磨碎하여 3ml의 0.2 N perchloric acid를 加하여 抽出한 後 15,000rpm에서 30分間 遠心分離하여 上澄液을 얻었다. 上澄液에 0.072mM 無水炭酸칼륨 溶液을 加하여 pH 7-8로 中和시키고, 15,000rpm에서 30分間 遠心分離하여 얻은 上澄液을 Dowex-50 칼럼(φ-0.7×5cm)에 loading한 後 8ml의 HPLC用 蒸溜水로 洗滌하고, 4 N NH_4OH溶液 3ml을 加하여 아미노산을 溶出시켰다. 溶出液을 모아서 40℃의 眞空 evaporator로 乾燥시킨 後 400μl의 HPLC用 蒸溜水에 녹여 아미노산 組成分析을 위한 試料로 使用하였으며, 分析條件은 表 1과 같다.

Table 1. Working conditions for amino acid analysis

Instrument	: Waters U6K Injector Waters 510 pump-2 Waters 680 Gradient controller Waters 441 Absorbance Detector Youngin D520 Integrator
Column	: Waters Amion Acid Analysis Liquid chromatography column
Flow rate	: 0.4ml/min
Temperature	: 62.0±1℃

結果 및 考察

Glufosinate-ammonium에 對한 水稻 品種間 反應

그림 1은 glufosinate-ammonium에 對한 水稻의 反應을 調査한 結果로서 113 水稻品種을 利用해 10ppm 處理時 나타나는 反應을 新鞘길이로 測定해 그 分布를 無處理에 對한 比로 나타내어 曲線을 그렸는데 相異한 反應을 나타내었다 (Figure 1). 無處理에 比해 50% 抑制되는 品種

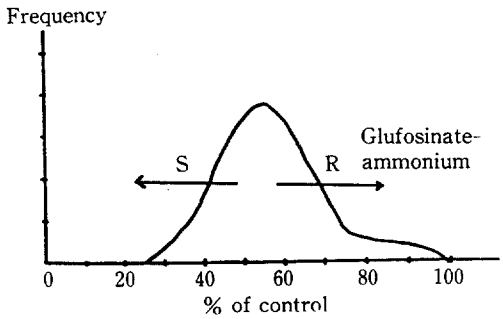

Figure 1. Freuqency distribution of 113 rice cultivars in terms of plant height inhibition as affected by glufosinate-ammonium. R : Resistance, S : Susceptibility

Table 2. Effect of glufosinate on plant height of several cultivars.

Cultivar	Plant height		% of control
	Control	10 ppm	
	···mm···		···%···
Tolerant group			
Fukei 126	29.2	28.0	95.9
Tamjinbyeo	39.0	39.6	101.5
Han 7	37.0	33.5	90.5
Hwacheongbyeo	34.3	31.5	91.8
Gehwa 5	32.2	28.6	88.8
Susceptible group			
Namyeongbyeo	35.3	13.0	36.8
Palgongbyeo	41.6	16.1	38.7
Yeongdugbyeo	38.9	15.4	39.6
Gayabyeo	41.0	14.9	36.3
Singwangbyeo	44.0	15.4	35.0

이 가장 많았고, 그 中에서 glufosinate-ammonium에 對한 感受性 程度가 多樣했는데 편의상 85% 以上을 耐性群으로, 40% 以下를 感受性群으로 分類하였다. R쪽은 耐性이 增加하는 쪽으로 전체의 4.4%, S쪽은 感受性이 增加하는 쪽으로 전체의 6.2%로 이를 基準으로 感受性과 耐性群을 各各 選拔하였다(Table 2). 上記의 基準으로 보면 탐진벼, Fukei 126, 한 7, 화청벼, 계화 5는 無處理에 比하여 101.5, 95., 90.5, 91.8, 88.8%로 耐性群으로 남영벼, 팔공벼, 영덕벼, 가야벼, 신광벼는 無處理에 比하여 36.8, 38.7, 39.6, 36.3, 35.0%로 感受性群으로 分類하였으며 除草劑에 對한 水稻品種 品種間에 큰 差異를 보였다. Shin 等[26]은 butachlor, thiobencarb, simetryn에 對한 水稻品種間에 큰 差異가 있음을 報告한 바 있다. 이것은 水稻品種內에 除草劑 耐性 source가 內在한다는 것을 意味하는데 우리가 耐性 source를 利用하면 除草劑 耐性品種 育成도 가능하리라 생각된다.

Glufosinate-ammonium에 의한 蛋白質 含量과 패턴

1. 總 水溶性 蛋白質 含量

上記 試驗에서 耐性과 感受性으로 選拔된 品種內의 蛋白質 含量을 測定하였는데(Table 3) 總水溶性 蛋白質 含量은 耐性品種으로 選拔된 Fukei 126과 탐진벼는 無處理에서 240.0, 207.2

Table 3. Total protein content of rice cultivars as affected by 10ppm glufosinate-ammonium[1].

Cultivars	Protein content (μg/100μl)		% of control
	10ppm	Control	
Tolerant group			
Fukei 126	234.0	240.0	97.5
Tamjinbyeo	184.0	207.2	88.8
Susceptible group			
Namyeongbyeo	191.0	236.3	80.8
Palgongbyeo	160.7	204.4	78.6
Yeongdugbyeo	181.1	255.4	70.1

[1] determined at 5 days after treatment

μg/100μl 이던 것이 glufosinate-ammonium 處理時 各各 234.0, 184.0μg/100μl로 減少하였고, 感受性 品種으로 選拔된 영덕벼, 팔공벼, 남영벼에서 255.4, 204.4, 236.3μg/100μl이던 것이 除草劑를 處理하면 181.1, 160.7, 191.0μg/100μl로 減少하였다. 耐性인 Fukei 126이 無處理에

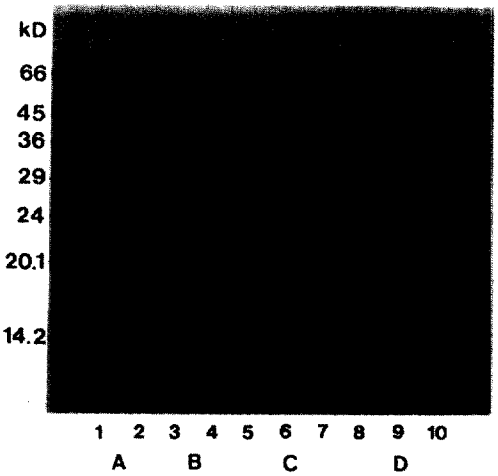

Figure 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in rice shoots as affected by glufosinate-ammonium. A : Tamjinbyeo (1 : Untreated control (UC), 2 : 10ppm), B : Fukei 126 (3 : UC, 4 : 10ppm), C : Palgongbyeo (5 : 2nd leaf-stage UC, 6 : lst leaf-stage UC, 7 : 10ppm), D : Namyeongbyeo (8 : 2nd leaf-stage UC, 9 : lst leaf-stage Uc, 10 : 10ppm). The size markers were the followes : bovine serum albumin (66kD), egg albumin (45 kD), rabbit glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36kD), bovine carbonic anhydrase (29kD), bovine tripsinogen (24 kD), soybean tripsin inhibitor (20.1kD), bovine α-lactalbumin (14.2kD)

對한 比가 97.5%로 가장 變化가 작았고, 感受性인 영덕벼가 70.1%로 變化가 가장 크게 나타났다. 總 蛋白質 含量의 差異는 아마도 이 除草劑가 酵素作用을 抑制하고, 代謝가 多少 正常的이지 못하기 때문으로 생각된다. 이 結果는 Kim 等[11]이 thiobencarb에 대한 總 蛋白質 含量이 耐性의 경우 크게 沮害되지 않는 반면 感受性의 경우 크게 沮害된다는 報告와 같은 傾向을 보인다.

2. 蛋白質 패턴의 變化

1) 1次元 電氣泳動(SDS-PAGE)

耐性 및 感受性으로 選拔된 品種의 總 水溶性 蛋白質 含量을 調査한 結果 多少의 變化를 보였으므로 1次元 電氣泳動하여 蛋白質 패턴을 調査하였다(그림 2). 感受性 品種인 팔공벼와 남영벼는 66kD 上位에 있는 band가 glufosinate-ammonium 處理에 의해 사라지는데 比해, 耐性인 탐진벼와 Fukei 126에서는 band의 變化가 없었다. 感受性 品種에서 變化된 band는 아마도 glutamine synthetase subunits 가운데 하나가

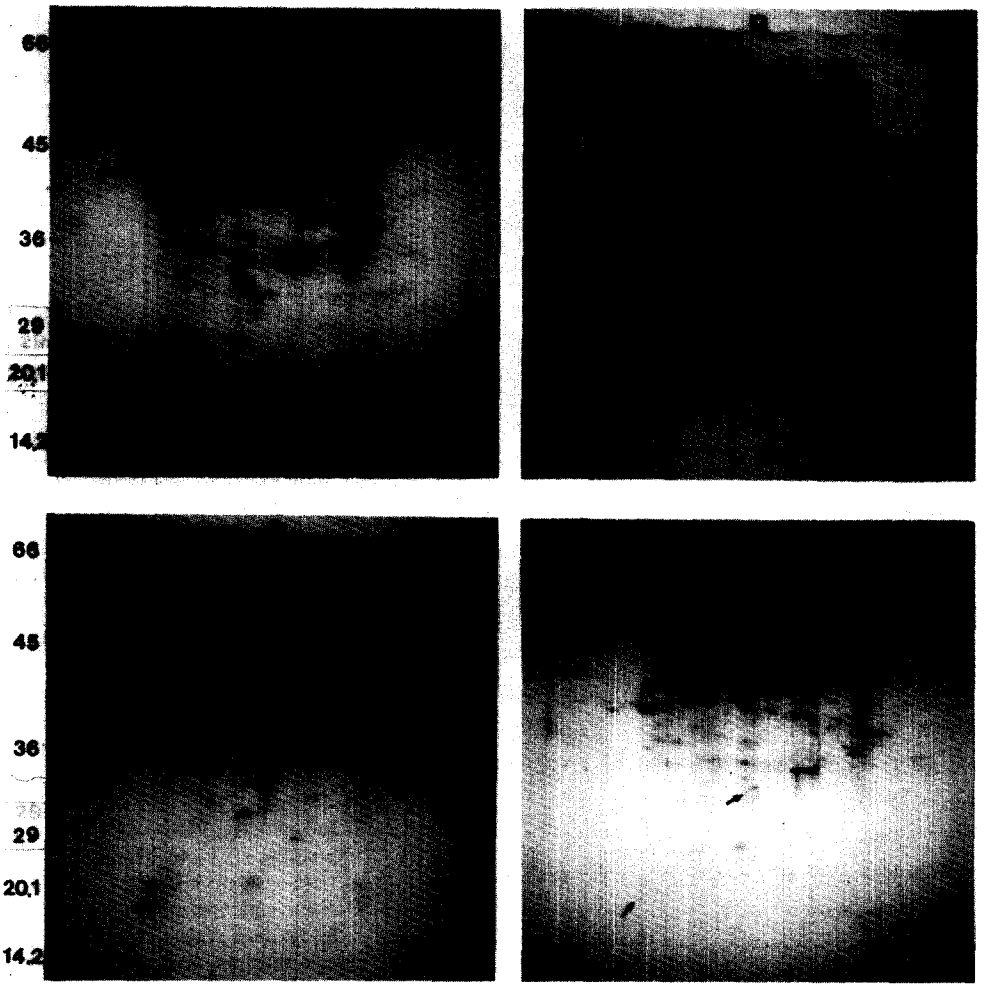

Figure 3. Protein patterns separated by two-dimensional gel electrophoresis in rice shoots as affected by glufosinate-ammonium : Untreated control in Tamjinbyeo(A), 10ppm of glufosinate-ammonium in Tamjinhyeo(B), Untreated control in Namyeongbyeo(C), 10ppm of glufosinate-ammonium in Namyeongbyeo.

아닌가 推定된다. 그리하여 이 band가 glufosinate-ammonium 耐性에 直接 關聯된 peptide 인지를 確證할 수 없기 때문에 2次元 電氣泳動을 實施하였다.

2) 2次元 電氣泳動(2D-PAGE)

Glufosinate-ammonium에 對한 水稻 品種間의 反應差가 1次元 電氣泳動上에서 나타났으므로 이를 좀 더 具體的으로 살펴보기 위하여 2D-PAGE를 實施하였다(Figure 3). 耐性인 탐진벼에서는 뚜렷한 差異를 살펴볼 수가 없었고, 感受性인 남영벼에서는 66kD는 45kD 사이의 spot과 20kD 부근의 spot이 除草劑 處理의 경우 사라지는 傾向을 보여 두 品種群間에 뚜렷한 差를 보였으며 이는 glutamine synthetase의 subunits 가운데 하나일 것이라는 推定을 좀더 確實히 뒷받침 해주고 있다. 次後에 이 spot을 確保하여 amino acid sequencing을 하게 된다면 水稻 品種間에 있어서 glufosinate-ammonium에 相異한 反應을 보이는 種內變異(intraspecific variation)를 確實히 說明할 수 있으이라 思料된다.

Glufosinate-ammonium과 glutamine sythetase 活性

1. Glutamine synthetase 活性

耐性으로 選拔된 탐진벼와 感受性으로 選拔된 남영벼를 對象으로 glutamine synthetase 活性의 變化를 調査하였다(Table 4). 耐性인 탐진벼에서는 酵素活性이 處理와 無處理에서 각각 44, 86 μmol GHA/mg protein/min으로 無處理에 對한 處理의 酵素活性은 51.2%이었고, 感受性인 남영벼에서는 處理와 無處理에서 각각 23, 68 μmol GHA/mg protein/min으로 無處理에 對한 酵素活性의 比가 33.8%로 耐性인 탐진벼에 比해 多少 弱한 反應을 보였다. 남영벼가 탐진벼에 比해 新鞘의 生育이 沮害되고 肉眼으로 흰 빛이 더 뚜렷하게 되는 것이 바로 glutamine sythetase의 活性이 더 印刷되기 때문인 것으로 推定할 수 있다.

2. 암모니아 含量

Glutamine synthetase 活性 變化의 結果를 뒷

Table 4. Glutamine synthetase(GS) activity of rice cultivars affected by glufosinate-ammonium.

Cultivar	Glufosinate		% of control
	10ppm	Control	
	···μmol GHA/mg protein/min···		···%···
Tamjinbyeo	44	86	51.2
Namyeong	23	68	33.8

Table 5. Ammonia content of rice cultivars as affected by glufosinate-ammoninium.

Cultivar	Glufosinate		% of control
	10ppm	Control	
	···mmol/g FW···		···%···
Tamjinbyeo	1.46	0.44	331.8
Namyeong	3.08	0.35	905.9

Table 6. Amino acid composition of rice cultivars as affected by glufosinate-ammonium[1].

Amino acids	HPLC area(×100)				% of control	
	Tamjin		Namyeong		Tamjin	Namyeong
	10ppm	Control	10ppm	Control		
Asp	3.060	4.566	3.918	7.939	67.0	49.4
Thr	10.538	17.852	9.677	102.940	59.0	9.4
Ser		26.270	16.471			
Glu	4.879	16.599	13.221	3.021	29.4	437.6
Pro	4.578	9.694	4.765	4.891	47.2	97.4
Gly	24.991	37.355	26.624	121.695	66.9	21.9
Ala	15.927	29.080	20.092	47.220	54.8	42.6
Val	11.215	40.986	18.697	35.945	27.4	52.0
Met	56.631	72.216	46.218	186.585	78.4	24.8
Ile, Leu	69.853	86.640	60.683		80.6	
Phe	22.268	30.644	33.202	54.065	72.7	61.4
His	468.632	190.200	811.510	529.680	246.4	153.2
Lys	673.840	657.875	564.150	1204.116	102.4	46.9
Arg	263.537	2172.639	2613.641	2012.506	121.7	129.9

[1] determined at 7 days after treatment

받침 하기 위해 glutamine synthetase의 基質로 利用되는 암모니아의 體內 蓄積量을 調査하였다 (Table 5). 耐性君인 탐진벼에서 1.46mmol/g FW, 無處理에서는 0.44mmol/g FW로 無處理에 對한 암모니아 含量의 比가 331.8%인데 比해, 感受性群인 남영벼에서는 3.08mmol/g FW, 無處理에서는 0.35mmol/g FW로 無處理에 對한 比는 905.9%로 약 3배 程度 더 體內에 蓄積되어 암모니아가 有害作用을 하여 感受性이 되는 것이 아닌가 思料된다.

3. 遊離 아미노산 組成

蛋白質 分析과 glutamine synthetase 活性에서 耐性群과 感受性群間에 뚜렷한 差異가 있었으므로 glutamine synthetase의 또다른 基質인 glutamic acid의 變化를 中心으로 遊離 아미노산의 組成을 살펴보았다(Table 6). HPLC 面積을 基礎로 하여 處理의 面積을 無處理의 面積의 比로 計算하여 比較하였더니 耐性인 탐진벼에서는 無處理와 處理가 各各 4.879, 16.599로 無處理에 對한 比가 29.4%이고, 感受性인 남영벼는 無處理와 處理가 各各 13.221, 3.021로 無處理에 對한 比가 437.65로 탐진벼에 比해 훨씬 많은 量이 體內에 蓄積되어 있음을 알수 있었다. 이는 암모니아의 體內蓄積이 感受性인 남영벼에서 훨씬 많았던 앞의 結果와 一致하는 것으로 암모니아와 glutamic acid가 glutamine synthetase의 基質로 利用되지 못하고 體內에 蓄積되어 있는 것으로 생각된다.

摘 要

Glufosinate-ammonium에 對한 水稻 品種間의 反應差異를 究明하고자 glufosinate-ammonium에 대한 感受性 反應, 總 水溶性 蛋白質 含量, 蛋白質 패턴의 變化, glutamine synthetase의 活性, 蓄積된 암모니아 含量, 遊離 아미노산 組成變化를 調査를 實施한 바 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Glufosinate-ammonium 10ppm에 대한 水稻 品種間 反應을 보면 Fukei 126과 탐진벼의 新鞘의 길이가 無處理區에 比해 各各 96%, 100%로 耐性品種으로, 영덕벼, 팔공벼, 남영벼는 新鞘의 길이가 無處理에 比해 各各 40%, 39%, 37%로 感受性品種으로 分類하였다.

2. 總 蛋白質 含量은 耐性品種으로 選拔된 Fukei 126과 탐진벼는 無處理에서 240.0, 207.2 μg/100μl이던 것이 處理에서 234.0, 184.0μg/100μl으로 無處理에 對한 比가 97.5%, 88.8%이었고, 感受性 品種으로 選拔된 영덕벼, 팔공벼, 남영벼는 無處理에서 255.4, 204.4, 236.3μg/100μl이던 것이 처리에서 181.1, 160.7, 191.0 μg/100μl으로 各各 無處理에 比해 70.1%, 78.6%, 80.8%로 耐性品種에 比해 크게 減少되었다.

3. 蛋白質패턴의 變化는 耐性品種인 탐진벼에서는 glufosinate-ammonium 10ppm 處理時에도 band의 density의 變化가 없었으나, 感受性 品種으로 選拔된 남영벼에서는 66kD 上位에서 band density가 減少하거나 사라지는 傾向을 보였다. 2D-PAGE에서도 마찬가지로 耐性인 탐진벼의 境遇는 spot의 變化가 거의 없었던 데 比해 感受性인 남영벼에서의 境遇는 45kD와 66kD사이, 20kD 부근에서 spot의 density가 減少하거나 사라지는 傾向을 보였다.

4. Glutamine synthetase의 活性은 耐性의 탐진벼는 處理와 無處理에서 各各 44, 86μmol GHA/mg protein/min로 無處理에 對한 處理의 酵素活性의 比가 51.2%이었고, 感受性의 남영벼는 處理와 無處理에서 23, 68μmol GHA/mg protein/min로 無處理에 對한 比가 33.8%로 나타나 耐性의 탐진벼에 比해 多少 弱한 反應을 보였다.

5. 암모니아의 體內蓄積量은 耐性의 탐진벼는 處理와 無處理에서 各各 1.46, 0.44mmol/g FW로 無處理에 對한 암모니아 含量의 比가 331.8%이었고, 感受性의 남영벼는 3.08, 0.35mmol/g FW로 無處理에 對한 比가 905.9%로 나타나 耐性의 탐진벼에서보다 약 3배 더 많은 것으로 나타났다.

6. 遊離 아미노산의 組成은 glutamine synthetase 基質인 glutamic acid가, 耐性의 탐진벼는 處理와 無處理에서 4.879, 16.599로 無處理에 對한 比가 29.4%로 줄어든 反面, 感受性인 남영벼는 處理와 無處理가 13.221, 3.021로 無處理에 對한 比가 오히려 약 430%로 增加되어 glutamine synthetase 基質로 利用되지 못하고

남아있었다.

引 用 文 獻

1. Anonymous. 1965. Report of the first session of the FAO working party of the experts on resistance of pests to pesticides, Rome, October 4th -9th.
2. Bradford, M.M.. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72 : 244-248.
3. Chen, Y. and T.M. Ching. 1988. Induction of barley leaf urease. Plant Physiol. 86 : 941-945.
4. Deak, M., G. Donn, A. Feher and D. Dudits. 1988. Dominant expression of a gene amplification-related herbicide resistance in medicago cell hybrids. Plant Cell Reports 7 : 158-161.
5. Deblock, M., J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gossele, N. Rao Movva, C. Thompson, M. Van Montagu and J. Leemans. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. The EMBO Journal Vol. 6. no. 9 pp. 2513-2518.
6. De Greef, W., R. Delon, M. De block, J. Leemans and J. Botterman : 1989, Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. Bio/Technology Vol. 7. (January) : 61-64.
7. D'Halluim, K., J. Botterman and W. De Greef. 1990. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. Crop Science Vol. 30 : 866-871.
8. Dodge, A.D.. 1989. Herbicide and plant metabolism. p. 214.
9. Hirel, B. and P. Gadal, 1980. Glutamine synthetase in rice. Plant Physiol. 66 : 619-623.
10. Kanamori, T. and H. Matsumoto. 1972. Glutamine synthetase from rice plant roots. Arch, Biochem. Biophy. 125 : 404-412.
11. Kim, H.Y., K.U. Kim and D.H. Shin. 1991. Protein patterns of rice cultivars affected by thiobencarb herbicide. Proc. of 13th Conference of the Asia Pacific Weed Science Sosiety (in press)
12. Köcher, H.. 1983. Influence of the light factor on physioolgical effects of herbicide Hoe 39866. Aspects of Applied Biology 4 : 227-234.
13. Köcher, H. and K.W. lötzsch. 1985. Uptake, translocation and mode of action of the herbicide glufosinate-ammonium in warm climate weed species. Proc. of 10th Conference of the Asia Pacific Weed Science Society 1 : 193-198.
14. Kolodziej, F.B.. 1983. Der einflub subletaler dosen von phosphinothricin auf ausgewählte stoffwechselreaktionen von *Sinapis Alba*. Diplomarbeit, Universitat Mainz.
15. Laemmli. U.K.. 1970. Clevage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London) 227 : 680-685.
16. Langelüddeke, P., R. Purusotman, M. Sallehhuddin and H. Kassebeer. 1983. Glufosinate -ammonium (Hoe 39866)-a new herbicide for *Imperata cylindrica*(L.) Beauv. and for general weed control in tropical plantation crops. Proc. of 9th Conference of the Asia Pacific Weed Science Soceity 413-423.
17. Lara, M., H. Porta, J. Padilla, J. Foloh and F. Sanchez. 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 76 : 1019-1023.
18. Lea, P.J., K.W. Joy, J.L. Ramos and M.G Guerrero. 1984. The action of 2-amino -4-(methylphosphinyl)-butanoic acid(phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. Phytochemistry Vol. 23. No. 1. pp. 1-6.
19. Leason, M., D. Cunliffe, D. Parkin, P.J. Lea and B.J. Miflin. 1982. Inhibition of pea glutamine synthetase by methionine-sulfoximine, phosphinothricin and other glutamate analogues. Phytochem. 21 : 855-857.
20. Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L.. J. Plant Physiol. Vol. 123 : 135-142.
21. Mothes, K.. 1958. Ammonia kentgifting und aminogruppenvorrat. In : Handbuch der Pflanzenphysologie(Ed. W. Ruhland) Springer Verlag. Vol. Ⅷ : 716-762.

22. Murakami, T., H. Anzai, S. Imai, A. Satoh, K. Nagaoka and J. Thompson. 1986. The bialaphos genes of *Streptomyces hygroscopicus*. Molecular cloning and characterization of the gene cluster. Mol. Gen. Genet. 5 : 42-50.
23. O'Farrell, P.H.. 1975. High-resolution two -dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250 : 4007-4021.
24. O'Neal, D. and K.W. Joy. 1973. Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. Arch. Biochem. Biophy. 159 : 113-122.
25. Puywain, P.D.. 1991. The resistance of plants to herbicides. Weed Control Handbook ; Principles(Ed. R.J. Hance and K. Holly). pp. 217-242.
26. Shin, D.H., K. Moody, F.J. Zapata and K.U. Kim. 1989. Differences in response of rice(*Oryza sativa* L.) cultivars to herbicides. Proc. of 12th Conference of the Asian Pacific Weed Science Society pp. 393-403.
27. Suwanwong, S., K. Usui and K. Ishizuka. 1990. Glufosinate tolerance in carrot cell suspension culture. Weed Research, Japan Vol. 35(1) 53-60.
28. Thompson, C.J., N. Rao movva, R. Tizard, R. Crameri, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO Journal Vol.6 no. 9 pp. 2519-2523.
29. Tischer, E., S. Dassarma and H.M. Goodman. 1986. Nucleotide sequence of an alfalfa glutamine synthetase gene. Mol. Gen. Gent. 203 : 221-229.
30. Wild. A. and R. Manderscheid. 1983. The effect of phsphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. Zeitschrift fur Naturforschung 39c : 500-504.