

## 제초제 Alachlor의 선택성에 관한 연구

### II. 대사론적 접근

황을철\* · 박창규\*\*

## Studies on the Selectivity of the Herbicide Alachlor

### II. A Metabolic Approach to Selectivity

Eul-Chul Hwang\* and Chang-Kyu Park\*\*

#### Abstract

Absorption, translocation, and metabolism of the herbicide alachlor in soybean, Chinese cabbage, and barnyard grass seedlings were examined and compared with each other using [phenyl-U-<sup>14</sup>C]alachlor in search of a primary factor contributing to the selectivity of alachlor.

When root of each seedling was immersed into the solution containing [<sup>14</sup>C]alachlor, the amount of absorbed radioactivity/mg dry matter of seedling which was suggested to be correlated with the susceptibility of plants to alachlor decreased in the order of soybean >> Chinese cabbage ≥ barnyard grass and the rate of translocation to shoot was Chinese cabbage ≥ barnyard grass >> soybean. These orders did not consistently explain the selective phytotoxicity of alachlor. Analyses of extracts by reverse phase chromatography showed that alachlor was detoxified by conjugation with glutathione in all three plants and the rate of glutathione conjugation of soybean, the resistant species to alachlor, was the greatest, while that of barnyard grass, the susceptible, was the lowest among three plants. This result explained well the selective phytotoxicity of alachlor.

Both absorption and translocation contribute undoubtedly to the selectivity by influencing the active internal concentration of alachlor. However, neither of them appeared to be a primary factor. It was concluded that the most important primary factor was the rate of glutathione conjugation, which detoxifies alachlor and plays an important role in selectivity.

---

\* 동아대학교 농과대학 농화학과(Department of Agricultural Chemistry, Dong-A Univ., Pusan)

\*\* 서울대학교 농업생명과학대학 농화학과(Department of Agricultural Chemistry, Seoul National Univ., Suwon)

## 서 론

식물체에 처리된 제초제는 식물체의 형태학적, 생화학적 특성의 차이에 따라 표적기관 또는 조직에도달되는 제초제 혹은 생리적으로 활성이 있는 그 분해산물의 농도 또는 양이 달라질 수 있다. 생체내의 이러한 농도 또는 양은 여러가지 인자들에 의해 지배받지만, 주로 세가지 인자 즉 흡수, 이행, 그리고 대사에 의해 좌우되며 이러한 인자들에 의한 복합작용으로 제초제의 선택성이 발현되는 것으로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. 1970년대 이후, 식물체내에서 제초제의 대사 과정, 작용 기작, 그리고 식물체의 생리, 생화학 등에 관한 광범위한 연구에 힘입어, 제초제의 선택성에 관여하는 여러 인자들중 가장 중요한 것은, 식물체가 체내에 도달된 제초제를 적극적으로 무독성화시키는 방어 체계인 생화학적 전환 능력 즉 대사인 것으로 인식되고 있다<sup>3)</sup>. 이러한 관점에서 저자들은 전보에서<sup>4)</sup> alachlor에 의해 피해를 입는 정도가 서로 다른 대두, 배추 및 피를 대상으로 각 식물체 유묘의 뿌리중 glutathione의 함량과 약해 정도를 대비하였고 각 식물체내에서 1일 이내에 전환되는 glutathione conjugation 반응의 몇가지 대사산물을 TLC로써 검출하였다. 또한 저자는<sup>5)</sup> 위의 세가지 식물체의 뿌리 절편에서 alachlor가 수용성 대사산물로 전환되는 대사 속도가 alachlor의 선택성과 밀접히 연관되어 있음을 밝힌 바 있다. 이러한 사실들은 glutathione conjugation 반응이 alachlor의 무독성화 반응으로 작용하여 alachlor의 선택성에 기여하는 주요 인자임을 시사하고 있다.

본 연구에서는 제초제 alachlor의 선택성이 발현되는 주 요인을 식물체간의 생화학적인 차이에서 찾고자, 전보에서 채택한 3종의 식물체 대두, 배추 및 피를 대상으로 [phenyl-U-<sup>14</sup>C]alachlor를 이용하여 흡수이행성과 대사에 관한 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Alachlor와 대사산물의 합성

표지 alachlor는 [phenyl-U-<sup>14</sup>C]alachlor로 Mon-

santo사로부터 분양받았는데, 그 비방사능은 22.2 mCi/mmole이었으며 방사화학적 순도는 99% 이상이었다. Alachlor 표준품은 원체를 (주)한농으로부터 분양받아 재결정하여<sup>4)</sup> 사용하였다. Alachlor의 초기 대사산물로 알려진 glutathione conjugate와 cysteine conjugate는 Leavitt 등의<sup>6)</sup> 방법에 준하여 합성하였다.

### 2. 뿌리를 통한 alachlor의 흡수와 이행

대두, 배추 및 피의 10일 유묘 뿌리를 표지 alachlor 수용액 100ml( $3.93 \times 10^{-6}$  M,  $4.81 \times 10^6$  dpm)에 잠기도록 하여 48시간 동안 경시적으로 표지 alachlor를 유묘내로 흡수이행하도록 하였다. 각 유묘를 흐르는 수도물로 씻고 물기를 제거하여 냉동건조한 후 이를 X-ray 필름(Konica A 5C, Sakura Co.)에 -20°C에서 20일간 노출시켜 autoradiography하였다. Autoradiogram을 얻은 후에 각 유묘를 뿌리부분과 줄기부분으로 나누어 각각을 연소기(Packard 306)로 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>로 산화시켜 그 가스를 1.0M methanolic benzethonium hydroxide(Sigma B 2156) 용액으로 포집하여 LSC(Beckman LS-6000)로써 방사능을 측정하였다.

### 3. Alachlor의 대사과정

표지 alachlor수용액( $3.93 \times 10^{-5}$  M alachlor,  $3.85 \times 10^7$  dpm)에다 파종 후 10일간 재배한 대두, 배추 및 피의 유묘를 뿌리부분만 잠기도록 하여 alachlor를 체내로 흡수이행하도록 하였다. 3시간 후에 유묘를 꺼내어 Hoagland 영양액에다 옮기어 10분 또는 3시간 동안 수경재배하였다. 수경재배가 끝난 유묘를 수도물과 증류수로 씻은 후에 3g 정도가 되도록 포기 단위로 얼음물에 예워 싸인 15ml 용량의 세포마쇄기에 넣어 적량의 80% acetone 수용액을 가하여 마쇄시켰다. 마쇄액을 10분간 원심분리(4000 ×g)한 후 상등액을 따라내어 membrane filter(Millipore, HVLP, pore size; 0.45μm)로 여과시킨 후, 질소가스로 천천히 농축시켰다. 농축액에다 용출용액인 50% acetonitrile in 1 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 용액을

적량 가하여 잔여물을 녹인 후에 100 $\mu$ l 분액을 취하여 역상 칼럼인 C-18( $\mu$ Bondapak, 10 $\mu$ m)을 장착한 HPLC(Waters Associates, Delta Prep 3000 solvent delivery module)로써 alachlor 및 그 대사산물을 분리하였고, 용출액은 45.0분까지 매 0.5분마다 시험관에 분획수집하였다. 각 분획물의 방사능을 LSC로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 흡수이행성

Alachlor를 수경액에 처리하여 뿌리를 통해 체내로 흡수, 이행시킨 대두, 배추 및 피의 유묘를 autoradiography하였다(Fig. 1).

대두의 경우 alachlor에 24시간에서 48시간 노출되어서야 생장이 활발한 상단부의 성장점과 잎까지 이행되었다. 반면에 배추와 피의 경우에는 6시간 노출에도 각각 잎의 상단부까지 이행되었다. 이 결과를 단순히 전보<sup>4)</sup> Fig. 1의 alachlor에 의한 경중의 약해(대두에서는  $10^{-4}$  M, 배추에서는  $10^{-5}$  M, 그리고 피에서는  $10^{-6}$  M alachlor 수용액 처리구에서 각각 심한 약해를 보였음)와 관련지을 경우, 본보 Fig. 1의 autoradiograms에서 보여 주는 흡수이행성은 alachlor의 선택성에 기여하는 것처럼 보였으나 배추와 피가 잎의 약해의 차이를 설명해 주지는 못하였다.

방사능에 노출된 시간별로 각 유묘의 방사능 흡

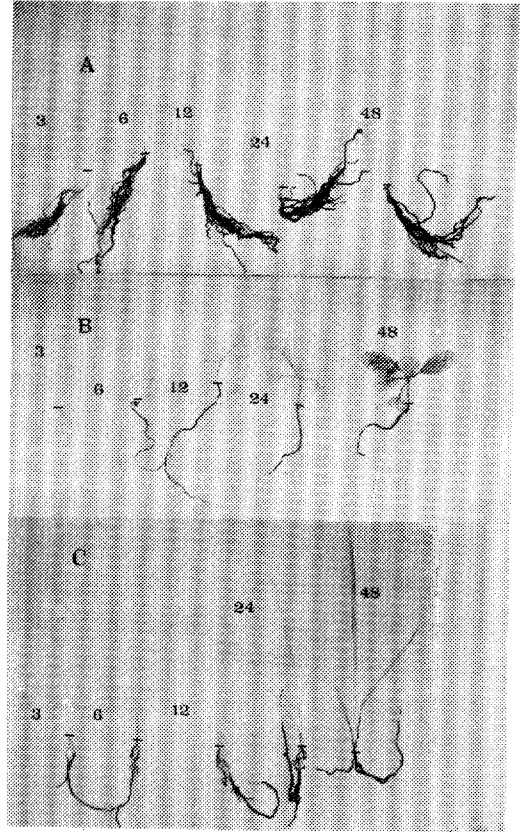


Fig. 1. Autoradiogram of soybean(A), Chinese cabbage(B) and Chinese cabbage seedlings(C). Root of each seedling was immersed into nutrient solution containing [ $^{14}$ C]alachlor for 3hr, 6hr, 12hr, 24hr and 48hr.

Table 1. Distribution of radioactivity in soybean seedling

Exposed time (hr)	Radioactivity (dpm/mg dry wt)		
	Absorption	Root	Shoot
3	148	459	2
6	332	1,172	3
12	876	2,632	19
24	1,136	3,728	30
48	1,246	4,186	36

Table 2. Distribution of radioactivity in Chinese cabbage seedling.

Exposed time (hr)	Radioactivity (dpm/mg dry wt)		
	Absorption	Root	Shoot
3	78	267	16
6	98	319	26
12	168	463	66
24	186	511	99
48	344	424	319

수량과 부위별 방사능 분포를 Table 1, 2, 3과 같이 건물중당 dpm으로 표시하였다.

전체적으로 노출된 시간에 관계없이, alachlor에 저항성인 대두의 경우 흡수량은 월등히 많았으나 상단부로의 이행속도는 매우 느렸고, 배추의 경우 흡수량은 가장 적었으나 이행속도는 가장 빨랐고, alachlor에 감수성인 피의 경우 대두와 배추의 중간 특성을 가졌으나 배추의 특성과 유사하였다. 이 결과를 전보의 Fig. 1에서 제시한 alachlor에 의한 경중의 약해와 관련지를 경우, 이행성은 alachlor의 선택성과 부분적으로 부합되는 경우도 있었으나 일치하지는 않았다. 또한 alachlor의 선택성에 더 중요하게 고려되어야 될 것으로 판단되는<sup>7)</sup> 흡수량은 저항성 종인 대두에서 감수성 종인 배추나 피에서 보다 월등히 많게 나타났으므로 식물체내에 활성이 있는 alachlor의 농도(혹은 양)를 낮추는 기작이 있음을 잘 보여준다.

Chloroacetanilide계를 포함한 많은 제초제의 경우 그 흡수량과 이행성(또는 흡수이행성)이 선택성에 기여하는 주 요인이라는 보문은 매우 많다<sup>7,8,9,10)</sup>. 그러나 이러한 연구는 식물체내에서 그 제초제의 작용 기작, 대사과정 등에 관한 연구가 미흡하였던 1970년대 이전에 이루어진 것이 대부분으로, 흡수이행된 화학종이 생리활성이 있는 모화합물인지 혹은 생리활성이 없는 대사산물인지에 대한 확인을 하지 않은 채 주로 autoradiography와 식물체 부위별 방사능의 분포에만 근거하였다. 따라서 본 실험에서

Table 3. Distribution of radioactivity in barnyard grass seedling.

Exposed time (hr)	Radioactivity (dpm/mg dry wt)		
	Absorption	Root	Shoot
3	70	149	12
6	159	306	24
12	365	702	47
24	605	1,286	119
48	617	1,095	247

관찰된 흡수이행성은 체내의 alachlor의 농도에 영향을 미쳐 alachlor의 선택성에 기여한다는 것은 부인할 수 없겠지만 주 요인은 아니라고 추정되었다.

## 2. 대사

모화합물인 alachlor와 합성한 glutathione conjugate 및 cysteine conjugate를 HPLC로 분리한 크로마토그램은 Fig. 2와 같다.

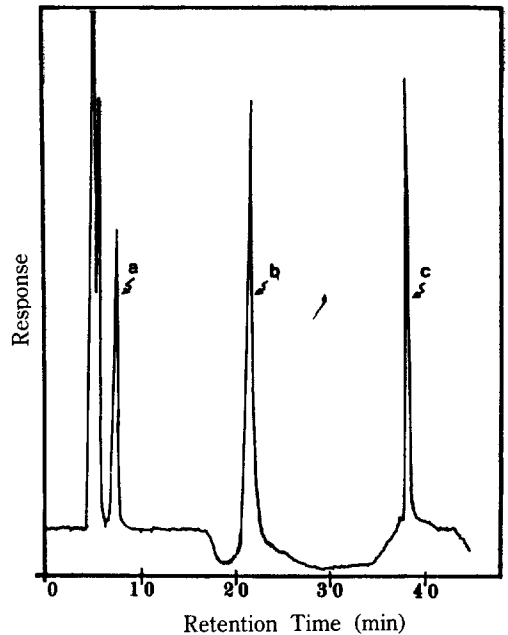


Fig. 2. HPLC analysis of synthetic glutathione conjugate(a), cysteine conjugate(b) and alachlor(c). Operating parameters of HPLC were as follows: Stationary phase was reversed-phased  $\mu$ Bondapak C-18,  $10\mu(\phi 4.6 \times 250\text{mm})$ . Stepwise programmed solvent system was 20% acetonitrile in  $1\text{mM NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  solution for first 7.0min, 50% acetonitrile in  $1\text{mM NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  solution after 25.0min. Flow rate was 1.0 ml/min. Column was regenerated for 3hr or more at the end of a solvent programing.

대사산물의 확인은 합성한 glutathione conjugate와 cysteine conjugate의 용출시간에 근거하였다. 각 시료의 추출물에서 얻은 분획물의 방사능을 LSC로 측정하여 개인용 컴퓨터로 재구성하여 크로마토그램(Fig. 3)을 얻었고, 이를 바탕으로 alachlor, glutathione conjugate 및 cysteine conjugate로의 방사능 분포를 Fig. 4와 같이 나타내었다.

식물체내에서 free thiol기를 갖는 물질은 거의 대부분 (homo)glutathione인 것으로 알려져 있고<sup>11, 12</sup>, 전보에서<sup>4</sup> 대두중 alachlor의 주 대사산물이 homoglutathione conjugate와 cysteine conjugate이었던 것으로 미루어, 대두 추출물에서 관찰되는 cysteine conjugate는 생체중의 cysteine과 alachlor가

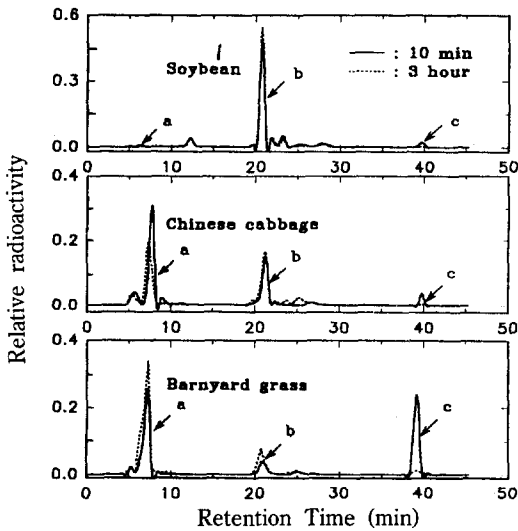


Fig. 3. HPLC analysis of soybean, Chinese cabbage and barnyard grass seedlings. Roots of seedlings were immersed into nutrient solution containing [<sup>14</sup>C] alachlor for 3hr. Seedlings were transferred to alachlor-free nutrient solution and harvested 10min and 3hr later. Operating parameters of HPLC were described in Fig. 2. Radioactivity of every 0.5min eluate was assayed by LSC. Peak : (a) glutathione conjugate, (b) cysteine conjugate, (c) alachlor.

직접 반응한 것이 아니라 glutathione conjugation 반응을 통해 전환된 glutathione conjugate가 탈아미노산화한 것으로 보였다. 따라서 세가지 식물체는 모두 alachlor를 동일한 과정 즉 glutathione conjugation 반응을 통해 대사하는 것으로 나타났다.

10분 경과시, 대두에서는 cysteine conjugate가, 배추에서는 glutathione conjugate가, 그리고 피에서는 alachlor와 glutathione conjugate가 주 peak로 검출되었다. 측정된 총 방사능중 대사되지 않은 alachlor가 차지하는 비율은 대두, 배추 및 피의 경우 각각 3%, 5% 및 36%였으며, glutathione conjugate (대두의 경우에는 homoglutathione conjugate)가 차지하는 비는 각각 1%, 45% 및 40%였으며, cysteine conjugate가 차지하는 비는 각각 60%, 28% 및 8%

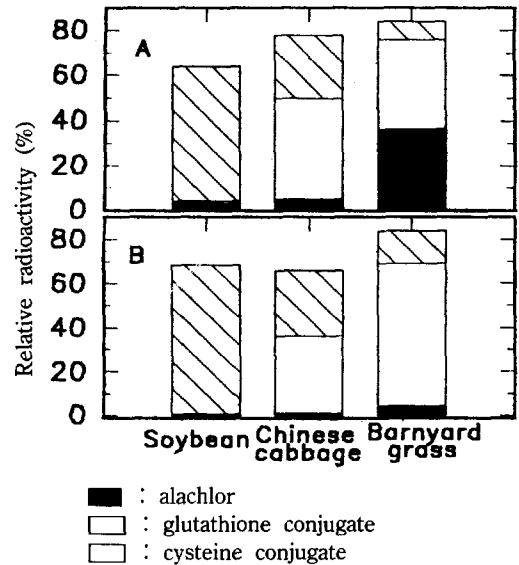


Fig. 4. Percent distribution of radioactivity into alachlor, glutathione conjugate, and cysteine conjugate in seedlings. Roots of seedlings were immersed into nutrient solution containing [<sup>14</sup>C] alachlor for 3hr. Seedlings were transferred to alachlor-free nutrient solution and harvested 10min(A), and 3hr(B) later.

였다.

3시간 경과시, 대두에서는 cysteine conjugate가, 배추에서는 glutathione conjugate와 cysteine conjugate가, 그리고 피에서는 glutathione conjugate가 주 peak로 검출되었다. 대두에서는 계측된 총 방사능중 cysteine conjugate가 차지하는 비는 68%로 10분 경과시의 것과 비슷한 수준이었고, 배추에서는 남아 있던 alachlor는 거의 모두 대사되었으며, glutathione conjugate와 cysteine conjugate의 비가 각각 35%와 30%로 10분 경과시의 것과 큰 차이가 없었다. 피에서는 대사산물의 조성비가 10분 경과시의 그것과 큰 차이가 있었는데, 총 방사능의 36%를 차지하던 alachlor의 비가 3%로 크게 줄어들었고 glutathione conjugate와 cysteine의 비가 각각 65%와 15%로 크게 늘어났다.

Alachlor가 무독성 화합물인 glutathione conjugate로 전환되는 대사속도는 chloroacetanilide계에 속하는 다른 제초제에 비하여 전체적으로 3종의 유묘 모두 빠른 편이었다<sup>11,12,13</sup>. 그러나 alachlor, (homo)glutathione conjugate 및 cysteine conjugate의 조성비로 보아 대사속도는 대두에서 가장 빨랐고, 배추에서 중간, 피에서 가장 느렸다. 이는 3종의 유묘에서 관찰한 alachlor에 의한 약해 정도 즉 alachlor의 선택성과 매우 잘 부합하였다. 또한 이 결과는 Breux의<sup>11</sup> 보고와도 부합하였다. Breux는<sup>11</sup>, 옥수수과 대두 등의 acetochlor에 저항성인 식물체에서, 피와 알팔파 등의 acetochlor에 감수성 식물체에서보다 acetochlor가 glutathione conjugation 반응을 통해 수용성 대사산물로 전환되는 대사속도가 3배 이상 높았으며, 각 식물체가 받는 acetochlor의 선택적 약해의 주 요인은 glutathione conjugation 반응을 통한 acetochlor의 무독성화 반응이었다고 보고하였다.

Alachlor는 이행되는 속도에 비해 빠르게 무독성화되는 것으로 판단되므로 Fig. 1에서 관찰한 흡수 이행된 방사능의 많은 부분은, 특히 저항성인 대두에서, 무독성화된 대사산물의 것으로 추정된다. 따라서 alachlor의 선택성에 기여하는 주 요인은 glu-

tathione conjugation 반응의 속도인 것으로 고찰된다.

## 결 론

제초제 alachlor의 선택성이 발현되는 주 요인을 식물체간의 생화학적 차이에서 찾고자, alachlor에 반응성이 다른 대두, 배추, 그리고 피를 대상으로 [phenyl-U-<sup>14</sup>C] alachlor를 이용하여 흡수이행성과 대사에 관한 실험을 수행하였다.

뿌리를 통해 [<sup>14</sup>C]alachlor를 식물체내로 흡수, 이행시킨 결과, 저항성인 대두에서는 흡수량은 월등히 많았으나 상단부로의 이행속도는 매우 느렸고, 배추에서는 흡수량은 가장 적었으나 이행 속도는 가장 빨랐고, 감수성인 피에서는 배추의 특성과 유사하였다. 이러한 결과는 alachlor의 선택적 약해 증상과는 부분적으로 부합하는 경우도 있었으나 밀접하게 일치하지는 않았다. 식물체의 추출물을 HPLC로써 분석한 결과, alachlor는 세 식물체에서 glutathione conjugation 반응을 통해 무독성화 대사산물로 전환되었으며 그 대사속도는 대두에서 가장 빨랐고 피에서 가장 느렸는데, 선택적 약해증상과 잘 부합하였다.

따라서 흡수이행성은 체내의 alachlor의 농도에 영향을 미쳐 선택성에 기여할 것으로 믿어지나 주 요인은 아닌 것으로 판단되었으며, alachlor의 선택성에 기여하는 가장 중요한 주 요인은 무독성화 반응인 glutathione conjugation 반응의 속도인 것으로 고찰된다.

## 참 고 문 헌

1. Ashton, F. M. and Crafts, A. S. (1981) : *Mode of Action of Herbicides*, Wiley Interscience publication, New york, p. 44.
2. Shimabukuro, R. H., Lamoureux, G. L. and Frear, D. S. (1978) : Glutathione conjugation: A mechanism for herbicide detoxication and

- selectivity in plants : In *Chemistry and Action of Herbicide Antidotes*; Pallos, F. M. and Casida, J. E. Eds., Academic Press, New York, p. 133.
3. Hathway, D. E (1989) : *Molecular Mechanisms of Herbicide Selectivity*, Oxford Science Publications.: Oxford University Press, p. 43.
  4. 박창규, 황을철 (1987) : 제초제 alachlor의 선택성에 관한 연구. I 약해와 글루타치온 conjugation 반응, 한국환경농학회지, **6(1)**, 44.
  5. 황을철 (1987) : 대두 및 피에서 제초제 alachlor의 비교대사, 동아대 농업기술연구소 연구보고 **8**, 1.
  6. Leavitt, J. R. and Penner, D. (1978) : In vitro conjugation of glutathione and other thiols with acetanilide herbicides and EPTC sulfoxide and the action of the herbicide antidote R-25788, *J. Agri. Food Chem.* , **27**, 533.
  7. Ashton, F. M. and Crafts, A. S. (1981) : *Mode of Action of Herbicides*, Wiley Interscience publication, New york, p. 91.
  8. Jaworski, E. G. (1969) : Analysis of the mode of action of herbicidal  $\alpha$ -chloroacetamides, *J. Agri. Food Chem.* , **17**, 165.
  9. Chandler, J. M., Basler, E. and Santelmann, P. W. (1974) : Uptake and translocation of alachlor in soybean and wheat, *Weed Science*, **22**, 253.
  10. Gortz, J. H. and Van Oorschot, J. L. P. (1984) : Uptake and translocation of [ $^{14}$ C] asulam and [ $^{14}$ C] bromacil by roots of maize and bean plants, *Pestic. Biochem. Physiol.* , **21**, 45.
  11. Breaux, E. J. (1987) : Initial metabolism of acetochlor in tolerant and susceptible seedlings, *Weed Science*, **35**, 463.
  12. Breaux, E. J., Patannella, J. E. and Sanders, E. F. (1987) : Chloroacetanilide herbicide selectivity: Analysis of glutathione and homoglutathione in tolerant, susceptible, and safened seedlings, *J. Agri. Food Chem.* , **35**, 474.
  13. Buchman, R. and Hamilton, D. (1981) : Design, synthesis, and biological activity of rigid acetanilide herbicides, *J. Agri. Food Chem.* , **29**, 1285.
  14. Shitotsuki, T., Koiso, A. and Eto, M. (1990) : Inhibition of glutathione transferase by S-benzyl glutathione analogous to the conjugate of saligenin cyclic phosphate, *Pestic. Biochem. Physiol.* , **37**, 121.
  15. Jablonkai, I. and Hatzios, K. K. (1991) : Role of glutathione and glutathione S-transferase in the selectivity of acetochlor in Maize and wheat, *Pestic. Biochem. Physiol.* , **41**, 221.
  16. Schr der, P., Lamoureux, G. L., Rusness, D. G. and Rennenberg, H. (1990) : Glutathione S-transferase activity in spruce needles. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **37**, 211.