

**Bentazon 分解酵素 活性이 옥수수 品種間
Bentazon 耐性에 미치는 影響***

尹旻洙 · 卞鍾英**

**Effect of Bentazon 6-hydroxylase Activity on
Tolerance of Corn Cultivars to Bentazon***

Min Soo Yun and Jong Yeong Pyon**

ABSTRACT

Tolerant corn cultivars to bentazon were selected and tolerance mechanism of corn cultivars to bentazon was studied by determining bentazon 6-hydroxylase(B6H) activity which was known to detoxify bentazon to 6-hydroxy bentazon at induced enzyme conditions with treatments of 1,8-naphthalic anhydride, ethanol and phenobarbital.

Tolerant cultivars to bentazon were selected by growth response of corn by foliar application of bentazon to corn cultivars. Kwanganok, GA 209, IK 2, DB 544, and Suwon 19 were tolerant to bentazon, but KSS 3, KSS 4, KS 5, and Danok 2 were susceptible.

Pretreating corn seeds with 1,8-naphthalic anhydride increased B6H activity at all cultivars, but the tendencies were more remarkable at Suwon 19 and GA 209, tolerant cultivars, than at Danok 2 and KS 5, susceptible cultivars. Treating corn shoots with ethanol increased B6H activity at Suwon 19 and GA 209. B6H activity was enhanced by treatments of ethanol at 1.0 or 2.5%, but decreased at ethanol 2.5 or 5.0% at Danok 2 and KS 5. Treating corn shoots with phenobarbital increased B6H activity at Suwon 19, GA 209, Danok 2, and KS 5 by treatments of phenobarbital at 2.0mM, but decreased at 4.0 or 8.0mM at all cultivars.

Therefore, the tolerant mechanism of corn cultivars to bentazon may be explained partially by the activity of bentazon 6-hydroxylase which detoxifies bentazon to 6-hydroxy bentazon.

Key words : Bentazon, bentazon 6-hydroxylase, 6-hydroxy bentazon, 1,8-naphthalic anhydride, ethanol, phenobarbital, corn

* 본 연구는 한국학술진흥재단 지원(1994)에 의하여 수행되었음.

** 忠南大學校 農科大學(College of Agriculture, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea)

<1995. 8. 17. 접수>

緒 言

식물은 제초제를 분해하는 효소의 대사능력에 차이가 있으며 내성 초종과 감수성 초종간에는 더욱 현저한 반응차이를 나타낸다. 이와 같은 생화학적 과정은 주로 히드록시 반응, 탈아미노기 반응, 탈알킬 반응, Sulphoxidation에 의하여 일어나며 Cytochrome P-450효소가 중요한 촉매 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다.^{19,39)}

Cytochrome P-450은 NADPH₂에 의하여 환원되며 환원된 Cytochrome P-450은 기질(RH)의 Oxygenation과 다른 산소원자를 물로 환원하는 반응을 일으킨다.⁷⁾ Cytochrome P-450은 Microsome의 CO 결합핵소로서 특이한 과장특성을 나타내며 Dithionite처리 Microsome에서 CO차등 흡수과장 중 450 nm에서 Soret흡수대를 나타낸다. Cytochrome P-450효소는 원심분리에 의하여 10,000g과 100,000g 사이에서 침전되는 Microsome 분획세포막에 존재하는 것으로 알려졌다. Microsome은 소포체, 퍼옥시솜, 액포막, 원형질막의 혼합성분으로 구성되어 있으나 Cytochrome P-450과 Oxygenase활성은 대부분 소포체와 관련이 있다.

Cytochrome P-450 연구는 포유동물의 간이나 세균을 대상으로 의학 및 약학 분야에서 집중적으로 이루어졌고 살충제 처리에 따른 분해 대사에 관하여도 많은 연구가 추진되었으며 상당한 연구성과도 있었다.⁶⁾ 그러나 식물조직에 존재하는 Cytochrome P-450함량은 매우 적기 때문에 이 효소에 대한 연구는 미미한 정도이다. 최근 아보카도(Avocado) 과피에는 pCMA와 기타 외부 화학물질의 탈메틸 반응에 작용하는 Cytochrome P-450이 풍부한 것으로 알려졌다.^{16,30)} 아보카도 Cytochrome P-450의 천연기질은 확인되지 않았다. Hallahan 등¹⁶⁾은 아보카도 과피로부터 Cytochrome P-450을 분리하여 분자수준에서 특성을 밝혔다. Cytochrome P-450은 발아중인 종자의 배유, 백화된 묘, 뿌리, hypocotyl, 자엽, 정아 등에서 검출되었으며 튜립, 백합과 같은 휴면 인경, Jerusalem arti-

choke, 감자, 고구마, Iris 지하경과 같은 저장 기관에도 Cytochrome P-450이 존재한다.³⁾

Cytochrome P-450 효소군은 여러 생합성 과정⁴¹⁾과 무독화 대사과정^{4,30,35)}에 작용하는 막과 관련된 헴단백질 Monooxygenase이다.¹⁸⁾ Cytochrome P-450은 식물에서 제초제의 무독성화(Detoxification) 대사에 중요한 역할을 하며 따라서 제초제의 선택성을 조절하는데 매우 중요하다.^{2,30)}

제초제의 대사에서 식물 Cytochrome P-450이 관련한다고 입증한 연구는 동물세포에서와는 달리 비교적 최근에 이루어졌다. Cytochrome P-450 monooxygenase에 의한 제초제의 In vitro 대사는 Phenylurea의 N-demethylation¹¹⁾, 2,4-D^{1,23)}, Diclofop^{12,25,42)}, Chlortoluron^{9,13,29)}, Primisulfuron¹⁰⁾의 Aryl hydroxylation이 보고 되었을 뿐이다.

한편 Bentazon은 벼, 콩, 옥수수에서 경엽처리 제초제로 널리 사용되고 있으며 작용기작은 광합성 제 2광계의 전자전달을 저해하여 광합성을 저해한다. Bentazon의 내성은 감수성 식물의 불활성 대사능력에 기인하며⁵⁾ 벼에서 주 대사물질은 6-hydroxybentazon과 8-hydroxybentazon을 생성하나 감수성 품종인 PI 229.342는 상기 대사물질을 생성하지 못한다고 한다.^{38,39)}

내성식물에서 대사과정은 두 단계 즉, Aryl hydroxylation에 이어 Glycosylation과정을 거쳐 분해대사가 일어난다.^{5,27,31)} 그리고 Rubin³⁶⁾등에 의하면 Aryl hydroxylation은 Cytochrome P-450에 의하여 촉매된다고 간접적 증거를 통하여 제안하였으며 Gronwald와 Connelly¹⁴⁾, MaFadden 등²⁶⁾, Sterling과 Balke³⁹⁾는 옥수수의 Microsome에서 Bentazon의 Aryl hydroxylation 반응은 Cytochrome P-450 monooxygenase에 의해 촉매된다고 하였다. 그러나 In vitro 실험을 통하여 제초제 대사에 Cytochrome P-450이 관여한다는 것을 입증하기는 매우 어렵다. 왜냐하면 식물에서 이들 반응을 촉매하는 Cytochrome P-450 함량의 수준은 매우 낮고 분리하는 동안 이들 효소의 안정성 문제가 있기 때문이다.

제초제 해독제(Safener)는 작물의 약해를 경

감시키는데 제초제의 무독성화 대사를 촉매시키는 효소를 유기시킴으로써 작물을 보호한다는 증거가 늘어나고 있다.^{2,40)} 해독제 1,8-naphthalic anhydride를 종자에 분의 처리하면 제초제 대사를 촉매하는 Monooxygenase 효소의 활성을 증대시킨다고 한다.^{2,26,40)} 그리고 McFadden 등²⁵⁾에 의하면 옥수수 종자를 1,8-NA 0.5% 분의 처리한 6일묘에서 Bentazon대사물질 6-hydroxybentazon이 생성되었으나 무처리에서는 대사가 일어나지 않았으며 이 대사물질은 Cytochrome P-450 효소에 의해 촉매된다고 제시하였다. 또한 포유동물의 Cytochrome P-450 유기물질로 알려진 Phenobarbital과 Ethanol 및 일부 제초제인 2,4-D와 Monuron도 Monooxygenase 활성을 증대시킨다고 보고하였다.^{33,34,37)}

따라서, 본 연구는 벼, 콩, 옥수수에서 경엽 처리 제초제로 널리 사용되고 있는 Bentazon을 대상으로 수경재배를 통하여 Bentazon에 의한 옥수수의 성장저해량을 측정하여 품종간에 Bentazon에 대한 내성의 차이를 검정하며 옥수수 품종별 Bentazon 분해대사에 관여하는 Bentazon 6-hydroxylase 효소의 활성을 검정하여 Bentazon에 대한 옥수수 품종간 내성기작을 밝히고자 수행되었다.

材料 및 方法

Bentazon(3-isopropyl-(1H)-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one-2,2-dioxide)에 의한 옥수수의 성장저해정도를 측정하여 품종간 내성차이를 구명하고, 내성기작에 관여하는 Bentazon의 히드록시반응 대사에 중요한 역할을 하는 Cytochrome P-450 효소를 ¹⁴C-bentazon를 이용하여 검정하였다.

I. Bentazon에 대한 옥수수 품종간 내성 차이

메옥수수(Normal corn)인 광안옥, GA 209, KSS 3, KSS 4, IK 1, IK 2, DB 544, KS 5, KS 6, 수원 19호, 찰옥수수(Waxy corn)인 단양, 흰찰 1호, 제원/오가리, 제원/당진, 찰옥 1호, 단

옥수수(Sweet corn)인 단옥 2호와 오페이크(Opaque)품종인 부여, Mexico를 공시하여 환경조절실에서 Kasugai영양액으로 2엽기까지 생장시킨 후, 균일한 개체를 선발하여 삼각플라스크(250ml)에 각각 5개체씩 3반복으로 옮긴 다음, Bentazon 1, 2, 4 kg/ha와 Tween 20 10%용액 1 l/ha(점착용액)를 혼합하여 CO₂ 가스분무기로 경엽처리하였다. 제초제 처리 후 10일 동안 환경조절실에서 Kasugai영양액으로 재배한 다음, 지상부의 성장량과 새로 신장한 잎의 건물중을 측정하여 얻은 성장반응 결과에 의하여 품종간 Bentazon의 내성정도를 검정하였다.

II. 옥수수 품종간 Bentazon 6-hydroxylase 활성 차이

실험 I에서 선발된 비교적 내성이 뚜렷한 수원 19호, GA 209 품종과 비교적 감수성이 뚜렷한 단옥 2호, KS 5 품종을 공시하여 Bentazon 분해효소의 활성을 증대시키는 1,8-naphthalic anhydride, Ethanol, Phenobarbital을 처리하였다. 지상부로부터 Microsome을 얻은 다음, 단백질 정량분석 후 공시 제초제와 반응시켜 Bentazon 6-hydroxylase 효소를 측정하였다.

1,8-naphthalic anhydride 처리는 0.25, 0.5, 1.0%(무게 기준)를 옥수수 종자에 분의 처리하여 여지로 말아 밀부분만 1mM CaSO₄ 용액에 담도록 담근 후에 항온기(28℃)에서 5일 동안 발아시킨 다음, 지상부를 채취하였고, Ethanol 처리는 옥수수 종자를 여지로 말아 1mM CaSO₄ 용액에 담근 후에 항온기(28℃)에서 5일 동안 발아시킨 옥수수 묘를 채취하여 Ethanol 1, 2.5, 5% 용액에 넣고 암조건에서 진탕기로 24시간 진탕한 다음, 지상부를 채취하였으며, Phenobarbital 처리는 Ethanol 처리와 마찬가지로 옥수수 종자를 여지로 말아 1mM CaSO₄ 용액에서 5일 동안 항온기(28℃)에서 발아시킨 옥수수 묘를 채취하여 Phenobarbital 2, 4, 8mM 용액에 넣고 암조건에서 진탕기로 24시간 진탕한 다음, 지상부를 채취하였다.

Microsome 분리는 채취한 옥수수의 지상부를 0.1mM Na phosphate 완충용액(0.1M Sodium

phosphate monobasic + 0.1M Sodium phosphate bibasic anhydrous : pH8)에 넣은 후에 흡습지로 수분을 제거하여 생체중을 측정하였다. 유발에 시료와 추출완충용액(0.1mM Na phosphate 완충용액 80mℓ + 100mM EDTA 10mℓ + 0.4M ascorbic acid 10mℓ + mercaptoethanol 97.6μℓ)을 넣고 마쇄하여 4장의 Cheese cloth로 여과하였다. 원심분리기로 4℃에서 시료를 10,000g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취하여 다시 냉동초원심분리기(Ultracentrifuge)에서 100,000g로 90분간 원심분리한 다음, 상등액을 버리고 pellet를 취하여 유리 균질기에 넣고 Na Phosphate 완충용액을 소량 넣어 재현탁하여 Microsome을 얻고 용량을 측정하였다.

단백질 정량분석은 Bradford법에 의해 Spectrophotometer로 absorbance A₅₉₅ nm에서 OD값을 측정하여 단백질량을 분석하였다.^{24,32)}

Bentazon 6-hydroxylase 효소검정은 ¹⁴C-bentazon(specific activity : 10.486 μ Ci/μ mol) 50 μ M을 반응vial(2mℓ)에 넣고 질소가스를 이용하여 증발시킨 다음, Microsome 시료를 단백질 1mg을 넣고 총량이 450μℓ이 되도록 Na phosphate 완충용액을 넣은 다음, 1mM NADPH 50 μℓ을 넣은 후 진탕수조(30℃)에 45분동안 반응시킨 후, 4N HCl + methanol(2 : 1)으로 반응을 정지시켰다. Ethyl acetate 1mℓ로 2회 추출하여 시험관에 넣고 질소가스로 증발시킨 후 Methanol 100μℓ을 넣어 재용해시켜 -80℃에 보관한 다음, TLC(Chloroform : Methanol : Amoniumhydroxide = 13 : 7 : 1)를 이용하여 Bentazon과 6-hydroxy bentazon을 분리한 다음, LSC(Liquid scintillation counter)를 이용하여 측정하였다.²⁰⁾

結果 및 考察

I. Bentazon에 대한 옥수수 품종간 내성 차이

Bentazon 1, 2, 4kg/ha를 경엽처리한 후 10일 동안 환경조절실에서 Kasugai영양액으로 재배

한 다음, 옥수수의 제3엽을 건조기에서 3일간 건조시킨 후 건물중을 조사한 결과, 제초제 농도가 높아짐에 따라 광안옥, IK 1, IK 2, DB 544, KS 6, 수원 19호, 흰찰 1호, 제원/오가리, 제원/당진, 부여, Mexico에서는 성장저해율이 10%미만으로 성장저해가 비교적 적은 반면, GA 209, KS 5, KSS 3, KSS 4, 단양, 찰옥 1호, 단옥 1호에서는 성장저해율이 10% 이상으로 그 성장저해가 크게 나타나는 경향을 보였다(Table 1). 특히 1kg/ha 처리시 IK 1, IK 2, 제원/당진, 부여에서, 2kg/ha 처리시 IK 1, 부여에서 성장저해가 거의 없었으며, KSS 3, KSS 4 품종은 1kg/ha 이상 처리시 11~51%의 성장저해율을 나타내므로써 가장 높은 성장저해를 보였다.

그리고, Bentazon 1, 2, 4kg/ha를 경엽처리한 후 10일동안 환경조절실에서 Kasugai영양액으로 재배한 다음, 옥수수의 새로 신장한 제4엽의 건물중을 조사한 결과, 제초제 농도가 높아

Table 1. Effect of bentazon on dry weight of 3rd leaves of corn cultivars 10 days after treatment.

Corn cultivars	Bentazon rate(kg/ha)		
	1.0	2.0	4.0
	—(% inhibition)—		
Kwanganok	6.06	9.09	12.12
GA 209	6.90	17.24	24.14
KSS 3	11.11	18.52	22.22
KSS 4	19.35	25.81	51.61
IK 1	0.00	0.00	6.25
IK 2	0.00	10.34	10.34
DB 544	8.33	11.11	8.33
KS 5	17.07	21.95	24.39
KS 6	8.33	8.33	12.50
Suwon 19	2.78	2.78	13.89
Danyang	3.45	20.69	20.69
Huinchal 1	6.67	10.00	10.00
Jewon/Ougari	3.57	3.57	3.57
Jewon/Dangjin	0.00	4.35	21.74
Chalok 1	7.89	13.16	10.53
Buyeo	0.00	0.00	4.88
Mexico	4.76	7.14	7.14
Danok 2	18.52	14.81	14.81

집에 따라 전체적으로 3엽 건물중보다 4엽 건물중이 더욱 큰 성장저해를 나타내었다. 또한 품종별로 살펴보면 GA 209, IK 2, DB 544, 흰찰 1호, 찰옥 1호, Mexico에서는 성장저해율이 20%미만으로 비교적 성장저해가 적은 반면, KSS 3, KSS 4, 단양, 제원/오가리, 부여에서는 성장저해율이 30% 이상으로 성장저해가 크게 나타나는 경향을 보였다(Table 2). 특히 찰옥 1호와 Mexico는 성장저해율이 각각 12.0, 13.3%로 가장 낮은 경향을 보였으며, 제원/오가리와 부여는 성장저해율이 각각 42.3, 40.3%로 가장 높은 경향을 보였다.

옥수수 지상부의 성장반응에 의한 품종간 Bentazon의 내성정도를 살펴보면 GA 209, IK 2, DB 544, 수원 19호는 성장저해율이 10%미만으로 가장 내성이 높았고, 광안옥, IK 1, 흰찰 1호, 제원/오가리, 제원/당진, 찰옥 1호, Mexico는 성장저해율이 10~15%로 비교적 내성이 있는 것으로 나타난 반면, KSS 3, KSS

4, KS 5, 단옥 2호에서는 성장저해율이 20% 이상으로 가장 감수성이 높았다(Table 3).

Hayes 등¹⁷⁾에 의하면 콩에서 Bentazon의 흡수는 내성 품종보다 감수성 품종이 약 두배가량 높다고 하였는데, 이는 Bentazon의 흡수와 이행과정^{21,22,27)}도 성장반응에 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한, Mine 등²⁷⁾은 벼에서 Bentazon에 대한 품종간 성장반응이 뚜렷하다고 하였으며, Fleming 등⁸⁾은 옥수수에서도 Bentazon에 대해 품종간에 다양한 반응형태를 나타내며, 특히 GA 209는 다른 품종에 비해 내성정도가 비교적 크다고 보고함으로써 본 실험과 유사한 경향을 나타냈다.

따라서, 이상의 결과를 정리해보면, 제초제 처리 10일 후 옥수수 품종별 성장량 차이는 제3엽보다 제4엽에서 비교적 뚜렷한 경향을 나타냄으로써 Bentazon의 제초효과는 제3엽보다 제4엽에서 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한, 성장반응에 의하여 나타난 품종간

Table 2. Effect of bentazon on dry weight of 4th leaves of corn cultivars 10 days after treatment.

Corn cultivars	Bentazon rate(kg/ha)		
	1.0	2.0	4.0
(% inhibition)			
Kwanganok	7.69	23.08	30.77
GA 209	10.53	15.79	21.05
KSS 3	10.00	50.00	50.00
KSS 4	23.81	19.05	47.62
IK 1	33.33	33.33	66.67
IK 2	16.67	16.67	25.00
DB 544	14.29	14.29	14.29
KS 5	0.00	25.00	37.50
KS 6	19.35	22.58	29.03
Suwon 19	16.67	16.67	33.33
Danyang	0.00	33.33	66.67
Huinchal 1	7.14	7.14	28.57
Jewon/Ougari	28.57	42.86	57.14
Jewon/Dangjin	0.00	33.33	33.33
Chalok 1	12.50	12.50	12.50
Buyeo	30.77	30.77	61.54
Mexico	3.85	11.54	26.92
Danok 2	14.29	35.71	28.57

Table 3. Effect of bentazon on dry weight of total leaves of corn cultivars 10 days after treatment.

Corn cultivars	Bentazon rate(kg/ha)		
	1.0	2.0	4.0
(% inhibition)			
Kwanganok	4.35	10.87	17.39
GA 209	6.38	8.51	14.89
KSS 3	7.41	25.93	29.63
KSS 4	19.51	24.39	51.22
IK 1	5.26	10.53	21.05
IK 2	2.70	13.51	13.51
DB 544	6.00	10.00	10.00
KS 5	16.67	25.00	30.56
KS 6	11.36	13.64	18.18
Suwon 19	6.67	6.67	13.33
Danyang	2.63	23.68	31.58
Huinchal 1	6.98	13.95	13.95
Jewon/Ougari	11.43	11.43	14.29
Jewon/Dangjin	3.70	11.11	25.93
Chalok 1	9.76	9.76	12.23
Buyeo	9.76	12.20	24.39
Mexico	4.41	8.82	14.71
Danok 2	16.67	22.22	25.00

Bentazon의 내성정도는 GA 209, IK 2, DB 544, 수원 19호에서 비교적 강한 내성을 나타냈으며, KSS 3, KSS 4, KS 5, 단옥 2호에서는 감수성을 나타냈다.

II. 옥수수 품종간 Bentazon 6-hydroxylase 활성 차이

실험 I에서 선발된 비교적 내성이 강한 수원 19호, GA 209와 감수성이 뚜렷한 단옥 2호, KS 5를 공시하여 옥수수 발아 5일 후 유식물을 각각 채취한 다음, 지상부로부터 Microsome을 얻어 단백질 정량분석 후 공시 제조제와 반응시켜 Bentazon 6-hydroxylase 효소를 측정 한 결과, 내성 품종인 수원 19호는 2.09pmol/mg/min, GA 209는 2.26pmol/mg/min으로 Bentazon 분해효소 활성이 비교적 높은 경향을 보였으며, 감수성 품종인 단옥 2호는 2.06pmol/mg/min, KS 5는 1.93pmol/mg/min으로 Bentazon 분해효소 활성이 비교적 낮은 경향을 보였다(Fig. 1). Connelly 등⁵⁾에 의하면 콩에서 Bentazon에 대한 내성 품종은 감수성 품종보다 약 100~300 배 가량 많은 대사물질이 형성되었다고 하였는데 이는 Cytochrome P-450 효소에 의해 촉매되는 제조제 분해대사 능력의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

한편, 일부 효소활성 유기화합물 중 제조제 해독제¹⁰⁾는 여러 제조제의 대사작용을 촉진시키는 경향이 있는데, Moreland 등²⁸⁾은 Naphthalic anhydride, Dichlormid, Flurazole, BAS 145138, Oxabetrinil, Fluxofenim, Benoxacor를 수수 종자에 처리하면 Bentazon과 Lauric acid의 대사작용을 촉진시켜 대사물질 형성을 증대시킨다고 보고하였다. 이와 같이 1,8-naphthalic anhydride가 Bentazon 분해효소의 활성을 증대시킨다는 보고들^{15,26,28)}을 근거로하여 옥수수 종자에 1,8-NA를 분의처리한 다음, 발아 5일 후에 유식물을 각각 채취하여 지상부로부터 Microsome을 얻어 Bentazon과 반응시켜 Bentazon 6-hydroxylase 효소를 측정 한 결과, 내성 품종인 수원 19호와 GA 209는 1,8-naphthalic anhydride 농도가 높아질수록 Bentazon 분해효

소 활성이 점점 증가해 1.0% 농도에서 각각 7.97, 20.71pmol/mg/min으로 높은 경향을 보인 반면, 감수성 품종인 단옥 2호와 KS 5는 1,8-naphthalic anhydride 농도가 0.25%가 될 때까지는 각각 4.01, 10.46pmol/mg/min으로 Bentazon 분해효소 활성이 점점 증가하나 0.25% 이상으로 농도가 높아질수록 감소하여 1% 농도에서 각각 3.21, 2.94pmol/mg/min으로 낮아지는 경향을 보였다(Fig. 2). Haack 등¹⁵⁾은 1,8-NA를 분의처리한 수수 종자에 Bentazon을 처리한 후, shoot에서 Microsome을 분리시 중간첨가물인 Ascorbate와 β -mercaptoethanol, EDTA를 첨가하면 Bentazon 6-hydroxylase 효소 활성이 무처리구에 비해 21.3배나 증가한다고 보고하였는데, 이는 본 실험에서 나타난 결과와 마찬가지로.

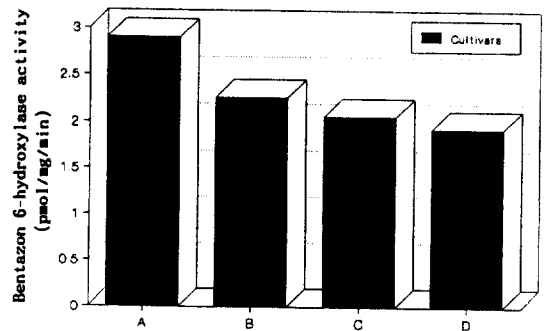


Fig. 1. Bentazon 6-hydroxylase activity in corn shoot microsomes, Suwon 19(A), GA 209(B), Danok 2(C), and KS 5(D).

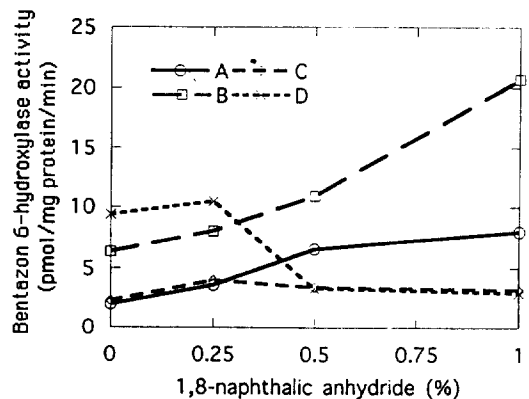


Fig. 2. Effect of 1,8-naphthalic anhydride on bentazon 6-hydroxylase activity in corn shoot microsomes, Suwon 19(A), GA 209(B), Danok 2(C), and KS 5(D).

Bentazon에 대한 1,8-NA 종차처리는 제조제 무독성화 대사작용에 관여하는 Bentazon 6-hydroxylase 효소의 활성을 촉진시킴으로써 작용의 약해를 경감시킬 수 있다고 사료된다.

Ethanol이 Bentazon 분해효소의 활성을 증대시킨다는 보고들^{33,34)}을 근거로하여 옥수수 발아 5일 후 유식물을 각각 채취하여 Bentazon 분해효소의 활성을 증대시키는 효소활성 유기화합물 Ethanol을 처리한 다음, 지상부로부터 Microsome을 얻어 Bentazon과 반응시켜 Bentazon 6-hydroxylase 효소를 측정된 결과, 내성 품종인 수원 19호와 GA 209는 Ethanol 농도가 높아질수록 Bentazon 분해효소 활성이 점점 증가하여 5% 농도에서 각각 1.81, 3.61pmol/mg/min으로 높은 경향을 보였다. 한편, 감수성 품종인 단옥 2호는 Ethanol 농도가 1.0%가 될 때까지는 2.13pmol/mg/min으로 Bentazon 분해효소 활성이 점점 증가하나 1.0% 이상 농도가 높아질수록 감소하여 5% 농도에서 1.22pmol/mg/min으로 낮아지는 경향을 보였으며, KS 5는 Ethanol 농도가 2.5%까지는 1.07pmol/mg/min으로 Bentazon 분해효소 활성이 점점 증가하나 2.5% 이상 농도가 높아질수록 0.71pmol/mg/min으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). Reichhart 등³⁴⁾은 Ethanol을 엉겅퀴과 식물의 피경에 처리하면 Hydroxylase의 활성을 촉진시키고 Cytochrome P-450의 함량을 증대시키며, 특히 Ethanol 300mM 처리

시 높은 증대 효과를 보였다고 보고함으로써 본 실험의 결과와 비슷한 경향을 나타냈다.

Phenobarbital이 Bentazon 분해효소의 활성을 증대시킨다는 보고들^{33,34)}을 근거로하여 옥수수 발아 5일 후 유식물을 각각 채취하여 Bentazon 분해효소의 활성을 증대시키는 효소활성 유기화합물 Phenobarbital을 처리한 다음, 지상부로부터 Microsome을 얻어 Bentazon과 반응시켜 Bentazon 6-hydroxylase 효소를 측정된 결과, 내성 품종인 수원 19호와 GA 209는 Phenobarbital 2mM까지 농도가 높아질수록 Bentazon 분해효소 활성이 각각 8.26, 7.38pmol/mg/min으로 증가하다가 다시 감소하여 8mM에서는 각각 6.19, 4.11pmol/mg/min으로 낮아지는 경향을 보였다. 감수성 품종인 단옥 2호와 KS 5도 마찬가지로 Phenobarbital 2mM까지 농도가 높아질수록 각각 4.65, 3.63pmol/mg/min으로 Bentazon 분해효소 활성이 증가하다가 다시 8mM에서는 각각 3.73, 2.56pmol/mg/min으로 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 전체적으로 Phenobarbital 농도별 Bentazon 분해효소 활성은 감수성 품종보다 내성 품종에서 약 2배정도 높은 것으로 나타났다(Fig. 4). Phenobarbital 4mM을 엉겅퀴과 식물의 피경에 처리하면 무처리구보다 Hydroxylase의 활성이 촉진되어 Cytochrome P-450의 함량이 증대되었다고 한다.³⁴⁾

따라서, 이상의 결과를 종합해 보면, 내성

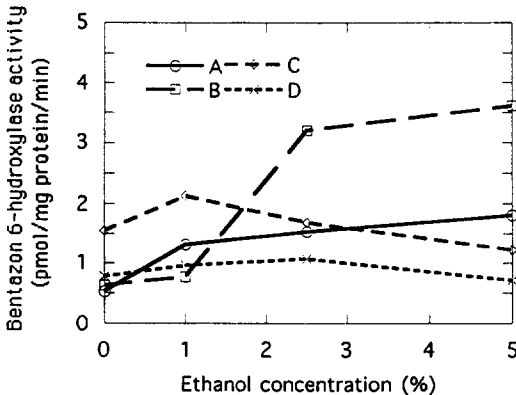


Fig. 3. Effect of ethanol on bentazon 6-hydroxylase activity in corn shoot microsomes, Suwon 19(A), GA 209(B), Danok 2(C), and KS 5(D).

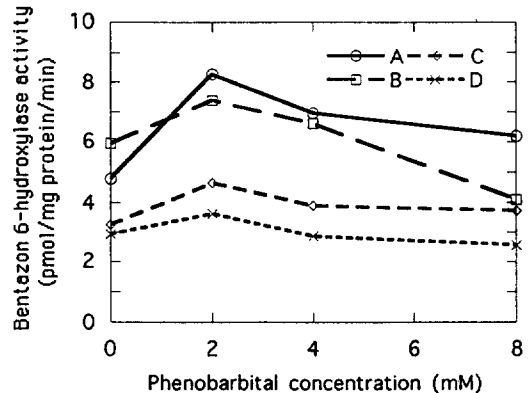


Fig. 4. Effect of phenobarbital on bentazon 6-hydroxylase activity in corn shoot microsomes, Suwon 19(A), GA 209(B), Danok 2(C), and KS 5(D).

품종인 GA 209와 수원 19호에서는 1,8-NA, Ethanol, Phenobarbital 처리에서 모두 B6H효소 활성이 감수성 품종인 단옥 2호와 KS 5보다 높은 경향이므로 B6H효소에 의한 Bentazon의 히드록시 반응, 즉 불활성 대사가 빨리 일어나기 때문에 Bentazon에 내성을 나타낸 것으로 사료된다.

摘 要

본 실험은 경엽처리 제초제로 널리 사용되고 있는 Bentazon에 의한 옥수수 생장저해량을 측정하여 옥수수 품종간의 내성차이를 구명하고, 선발된 내성 및 감수성 옥수수 품종을 공시하여 효소활성 유기화합물 1,8-naphthalic anhydride, Ethanol, Phenobarbital로 처리한 후 Microsome을 얻은 다음, ^{14}C -bentazon을 공시하여 TLC(Chloroform : Methanol : Amonium hydroxide=13 : 7 : 1)와 LSC를 이용하여 Bentazon 불활성 분해효소 Bentazon 6-hydroxylase (B6H)를 측정하여 옥수수 품종간 내성기작을 밝히고자 수행되었다.

1. 생장반응에 의한 품종간 Bentazon의 내성 정도는 GA 209, IK 2, DB 544, 수원 19호에서 강하게 나타났으며, KSS 3, KSS 4, KS 5, 단옥 2호에서는 감수성을 나타냈는데, 특히 3엽보다 4엽에서 더욱 뚜렷하였다.
2. 내성 품종인 수원 19호와 GA 209는 Bentazon 6-hydroxylase 활성이 감수성 품종인 단옥 2호와 KS 5에 비해 비교적 높은 경향을 보였다.
3. 내성 품종인 수원 19호와 GA 209에서는 1, 8-NA 0.5% 이상, Ethanol 2.5% 이상에서 B6H 활성이 높은 경향을 보인 반면, 감수성 품종인 단옥 2호와 KS 5에서는 1,8-NA 0.25% 이상, Ethanol 1.0, 2.5% 이상에서 B6H 활성이 낮은 경향을 보였다. 그리고, Phenobarbital은 2mM에서 B6H 활성이 가장 높았으며, 내성 품종은 전반적으로 감수성 품종보다 약 2배정도 높은 활성을 나타냈다.

4. 내성 품종인 수원 19호와 GA 209에서는 1, 8-NA, Ethanol, Phenobarbital 처리에서 모두 B6H효소 활성이 감수성 품종인 단옥 2호와 KS 5보다 높은 경향이므로 B6H효소에 의한 Bentazon의 히드록시 반응 불활성 대사가 빨리 일어나기 때문에 Bentazon에 내성을 나타낸 것으로 사료된다.

引 用 文 獻

1. Adele, P. et al. 1981. Induction of cytochrome P-450 and monooxygenase activity by 2,4-D in higher plant tissue. *Plant Sci. Letters* 22 : 39-46.
2. Barrett, M. 1989. Reduction of imazaquin injury to corn and sorghum with antidotes. *Weed Sci.* 37 : 34-41.
3. Benveniste, I., J.P. Salaun, and F. Durst. 1977. Wounding-induced cinnamic acid hydroxylase in Jerusalem artichoke tuber. *Phytochem.* 16 : 69-73.
4. Cole, D. 1983. Oxidation of xenobiotics in plants. *Progress in Pesticide Biochem, and Toxicology*(D.H. Hutson and T.R. Roberts, eds) Vol. 3. pp.199-254. John Wiley & Sons Ltd.
5. Connelly, J.A. et al. 1988. Bentazon metabolism in tolerant susceptible soybean genotypes. *Weed Science* 36 : 417-423.
6. Coon, M.J. and R.E. White. 1980. Cytochrome P-450, a versatile catalyst in monooxygenation reactions. In *Metal ion activation of dioxygen*(T.G. Sapiro, ed) pp.73-124. John Wiley & Sons.
7. Donaldson, R. and D.G. Luster. 1991. Multiple forms of plant cytochrome P-450. *Plant Physiol.* 96 : 669-674.
8. Fleming, A.A., P.A. Banks, and J.G. Legg. 1988. Differential response of maize inbreds to bentazon and other herbicides. *Plant Sci.* 68 : 501-507.

9. Fonne-Pfister and R., J. Gaudin. 1990. Ring-methyl hydroxylation of chlortoluron by an inducible cytochrome P450-dependent enzyme from maize. *Phytochem.* 29 : 2793-2796.
10. Fonne-Pfister, R., J. Gaudin, K. Kreuz, K. Ramsteiner, and E. Ebert. 1990. Hydroxylation of primisulfuron by an inducible cytochrome P450-dependent monooxygenase system from maize. *Pesticide Biochem. Physiol.* 37 : 165-173.
11. Frear, D.S., H.R. Swanson, and F.S. Tanaka. 1969. N-demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas : Isolation and characterization of a microsomal mixed-function oxidase from cotton. *Phytochem.* 8 : 2157-2169.
12. Frear, D.S., H.R. Swanson, and F.W. Thaler. 1991. Induced microsomal oxidation of diclofop, triasulfuron, chlorsulfuron, and linuron in wheat. *Pest. Biochem. Physiol.* 41 : 274-287.
13. Gonneau, M., B. Pasquette, F. Cabanne, and R. Scalla. 1988. Metabolism of chlortoluron in tolerant species : possible role of cytochrome P-450 monooxygenase. *Weed Research* 28 : 19-25.
14. Gronwald, J.W. and J. Connelly. 1991. Effect of monooxygenase inhibitors on bentazon uptake and metabolism in maize cell suspension cultures. *Pesticide Biochem. Physiol.* 40 : 284-294.
15. Haack, A.E., N.E. Balke. 1994. Enhancement of microsomal bentazon 6-hydroxylase and cinnamic acid 4-hydroxylase activities from grain sorghum shoots. *Pesticide Biochem. Physiol.* 50 : 92-105.
16. Hallahan, K.L. et al. 1992. Interaction of avocado cytochrome P-450 with monoterpenoids. *Plant Physiol.* 98 : 1290-1297.
17. Hayes, R.M., and L.M. Wax. 1975. Differential intraspecific responses of soybean cultivars to bentazon. *Weed Sci.* Vol. 23 : 516-521.
18. Hendry, G. 1986. Why do plants have cytochrome P-450? Detoxification versus defence. *New Phytol.* 102 : 239-247.
19. Jones, O.T.G. and J.C. Caseley. 1989. Role of cytochrome P-450 in herbicide metabolism. *Proc. Brighton Crop Protection Conf. Weeds.* 9B1 : 1175-1184.
20. Leah, J.M., T.L. Worrall, and A.H. Cobb. 1991. A study of bentazon uptake and metabolism in the presence and the absence of cytochrome P-450 and acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors. *Pesticide Biochem. Physiol.* 39 : 232-239.
21. Mahoney, M.D., and D. Penner. 1975. Bentazon translocation and metabolism in soybean and navy bean. *Weed Sci.* Vol. 23 : 256-271.
22. Mahoney, M.D., and D. Penner. 1975. The basis for bentazon selectivity in navy bean, cocklebur, and black nightshade. *Weed Sci.* Vol. 23 : 272-276.
23. Makeeve, A.M., A.Y. Makoveichuk, and D.I. Chakanikov. Microsomal hydroxylation of 2,4-D in plants. *Doklady Akedemii Nauk SSSR* 233 : 1222-1225.
24. Marion M, Bradford. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 : 248-254.
25. Mc Fadden, J.J., D.S. Frear, and E.R. Mansager. 1989. Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 dependent monooxygenase from wheat. *Pesticide Biochem. Physiol.* 34 : 92-100.
26. Mc Fadden, J.J., J.W. Gronwald, and C.V. Eberlein. 1990. In vitro hydroxylation of

- bentazon by Microsomes from naphthalic anhydride-treated corn shoots. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 168 : 206-213.
27. Mine, A., M. Miyakado, and S. Matsunaka. 1975. The mechanism of bentazon selectivity. *Pest. Biochem. Physiol.* 5 : 566-574.
 28. Moreland, D.E., F.T. Corbin, and J.E. McFarland. 1993. Effect of safeners on the oxidation of multiple substrates by grain sorghum microsomes. *Pesticide Biochem. Physiol.* 45 : 43-53.
 29. Mougin, C., F. Cabanne, M. Canivenc, and R. Scalla. 1990. Hydroxylation and N-demethylation of chlorotoluron by wheat. *Plant Sci.* 66 : 195-203.
 30. O'keefe, D.P. and K.J. Leto. 1988. Cytochrome P-450 from the mesocarp of avocado (*Persea americana*). *Plant Physiol.* 89 : 1141-1149.
 31. Otto, S. et al. 1979. Investigation into the degradation of bentazon in plant and soil. In *Advances in Pesticide Science* (H. Geissbuhler), Part 3, pp.551-556. Pergamon Press, Oxford.
 32. Potts, J.R., R. Weklych, and E.E. Conn. 1974. The hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 249 : 5019-5026.
 33. Reichhart, D. et al. 1979. Induction by manganese, ethanol, phenobarbital, and herbicides of microsomal cytochrome P-450 in higher plant tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 196 : 301-303.
 34. Reichhart, D. et al. 1980. Time course of induction of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome c reductase, and cinnamic acid hydroxylase by phenobarbital, ethanol, herbicides, and manganese in higher plant Microsomes. *Plant Physiol.* 66 : 600-604.
 35. Romesser, J.A. and D.P. O'keefe. 1986. Induction of cytochrome P450-dependent sulfonylurea metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 140 : 650-659.
 36. Rubin, B., J.R.C. Leavitt, D. Penner, and A.W. Saettler. 1980. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 25 : 623-629.
 37. Slaun, J.P. et al. 1981. Induction and specificity of a(cytochrome P-450)-dependent laurate in-chain-hydroxylase from higher plant microsomes. *European J. Biochem.* 119 : 651-655.
 38. Sterling, T.M. and N.E. Balke. 1989. Differential bentazon metabolism and retention of bentazon metabolites by plant cell cultures. *Pesticide Biochem. Physiol.* 34 : 39-48.
 39. Sterling, T.M. and N.E. Balke. 1990. Bentazon uptake and metabolism by cultured plant cells in the presence of monooxygenase inhibitors and cinnamic acid. *Pesticide Biochem. Physiol.* 38 : 66-75.
 40. Sweetser, P.B. 1985. Safening of sulfonylurea herbicides to cereal crops : Mode of herbicide antidote action. *Proc. British Crop Prot. Conf. Weeds.* 1147.
 41. West, C.A. 1980. Hydroxylases, monooxygenases, and cytochrome P-450. In *Biochemistry of Plants* (D.D. Davies, ed). Vol. 2. Academic Press.
 42. Zimmerlin, A. and F. Durst. 1990. Xenobiotic metabolism in plants : Aryl hydroxylation of a diclofop by a cytochrome P-450 enzyme from wheat. *Phytochem.* 29 : 1729-1732.