

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

I. Callus, 單細胞 及 原形質體 反應\*

鞠龍仁 · 具滋玉 · 李恩京\*\*

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

I. Differential Responses of the Calli, Cells and Protoplasts\*

Kuk, Y.I., J.O. Guh and E.K. Lee\*\*

### ABSTRACT

The tolerant and susceptible rice cultivars to oxyfluorfen were selected from 400 rice cultivars in a laboratory, and tested in comparison with barnyardgrass, a typical oxyfluorfen susceptible weed. The responses to oxyfluorfen in the different levels of calli, cells and protoplasts of the rice cultivars were investigated.

$I_{50}$  value of the tolerant rice cultivars was about  $10^{-4}M$ , whereas that of the susceptible rice cultivars and barnyardgrass was about  $10^{-6}M$ , showing significant difference between the two groups.

The growth rate of calli segregated from the tolerant rice cultivars was higher than that from the susceptible rice cultivars and barnyardgrass by treatment of oxyfluorfen to the calli. The growth rate of suspension-cultured cells of the tolerant rice cultivars was higher than that of the susceptible rice cultivars and barnyardgrass after treatment of oxyfluorfen. The viability of protoplasts from the tolerant rice cultivars was higher than that from the susceptible rice cultivars and barnyardgrass after one or two hours of oxyfluorfen treatment. The intactness of protoplasts from the tolerant rice cultivars was also higher than that from the susceptible rice cultivars and barnyardgrass.

Key words : Oxyfluorfen, tolerance, rice, calli, cell, protoplast

### 緒 言

Oxyfluorfen은 쌍자엽식물과 일년생 대부분의 단자엽식물에 대하여 土壤 혹은 莖葉을 통

한 강한 接觸殺草性을 나타내며,<sup>31,38)</sup> 동일 DPE 계인 nitrofen보다도 약 10배의 강한 生理活性을 갖는 것으로 보고 되고 있다.<sup>39)</sup> 植物種間에도 oxyfluorfen에 대한 耐性의 차이가 있을뿐만 아니라<sup>21)</sup> 品種間<sup>15)</sup>이나 동일 品種內의 동일 개

\* 본 연구는 한국과학재단 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부임.

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

<1996. 2. 5 접수>

체내에서도 葉齡에 따른 일 表面의 구조변동에 따라 차이를<sup>10)</sup> 보인다. Grabowski 등<sup>12)</sup>과 South<sup>32)</sup>는 oxyfluorfen이나 DPE계에 대한 感受性 차이가 식물체의 表皮 組織이나 外皮의 wax 층 발달 정도와 관계가 있다고 보고한 바 있다.

Oxyfluorfen은 양파,<sup>9,17,29,31)</sup> 고추,<sup>3)</sup> 마늘,<sup>17,18)</sup> 양배추,<sup>11)</sup> fababeen<sup>35)</sup>의 포장에서 잡초 발생전 및 발생직후 처리로 사용이 가능한 것으로 보고되었다. DPE계의 水稻用 除草劑로는 nitrofen이 1970년대에 우리나라에서 사용되었던 바 있으나 통일계 벼品种에 대한 다소의 藥害와 毒性이 문제되어<sup>22)</sup> 생산이 중지되었으며, 이후에는 chlornitrofen, chlormethoxil 및 bifenoxt<sup>22)</sup>과 같이 비교적 안정성이 높은 藥劑들로 대체되어 사용되기에 이르렀다. 특히, 이들 藥劑보다 高度의 植物 生理活性을 갖는 oxyfluorfen은 Iha 면적에 5~20g 미만의 소량으로도 기존의 어느 藥劑보다 폭 넓은 草種에 대한 選擇 除草力を 갖기 때문에 관심의 초점이 되고 있어 벼에 사용 여부를 검토하고 있는 실정이다.<sup>14,15,27,40)</sup>

벼의 사용 실례로 柳<sup>40)</sup>는 oxyfluorfen을 벼 이양전에 토양 혼화처리로 사용 가능성이 있음을 보고한 바 있으며, Prasan과 Price<sup>27)</sup>는 잡초발생전 처리로 벼에 다소의 藥害는 있었으나 사용 전망이 밝음을 보고한 바 있다. 또한 具 등<sup>14)</sup>은 移秧畠에서 極微量의 oxyfluorfen을 分施 處理하여 피에 대한 선택 방제효과를 얻을수 있음을 시사하였다.

많은 除草劑 抵抗性 cell line들이 callus, suspension 그리고 protoplast 培養을 통하여 선발된 사례들이 있다. 즉, Thomas와 Pratt<sup>34)</sup>은 野生型 細胞中에서 paraquat 致死濃度에 자라는 토마토 callus clone을 선발하였고, Chaleff와 Ray<sup>2)</sup>는 chlorsulfuron 또는 sulfometuron methyl이 2ppm 함유된 MS 배지에 callus를 옮겨 除草劑抵抗性 담배의 cell line을 분리하였다. 또한 Swanson 등<sup>33)</sup>은 haploid의 protoplast를 이용하여 chlorsulfuron에 耐性을 나타내는 배추(*Brassica napus* L.)를 분리하였다.

機內 培養된 細胞를 이용하여抵抗性 品種

間 차이를 檢定하는 이유는 생육 환경의 조절이 쉽고 藥劑의 吸收가 용이하므로 다른 요인의 간섭을 배제시킬 수 있으며, callus 培養<sup>8,20)</sup>이나 細胞 懸濁培養<sup>34)</sup>을 통하여 생리적 연구나 抵抗性 機作 및 耐性 變異體 選拔을 연구할 수 있는 장점이 있어 이를 이용한 연구가 활발히 추진되고 있다. 그러나 機內 培養細胞는 기관이 분화되어 있는 식물체와 細胞單位의 代謝가 다를 수 있으며, 또한 장기간 배양으로 인한 機能的 變異性이 있을 수 있고, 光合成과 蒸散作用 및 物質의 轉移가 일어나지 않는 단점이 있다.<sup>31)</sup>

Zilkah 등<sup>41)</sup>은 11植物種의 유묘와 callus에 光合成 毒害 除草劑를 처리한 경우 callus의 生長 저해와 유묘에 대한 약해반응은 직접적인 상관이 없다고 하였고, Nakamura<sup>24)</sup>는 벼에서 選擇性 除草劑인 tetrapion(sodium 2, 2-tetrafluoropionate, TFP)이 첨가된 배지에서 callus 培養과 細胞 懸濁培養을 한 결과, tetrapion이 1,000mg/l의 고농도로 처리된 배지에서 callus는 생장이 억제되었으나, 幼苗는 아주 낮은 농도인 2mg/l에서 50%의 生육억제를 보임으로써 幼苗와 callus 및 懸濁細胞의 生육저하 현상은 일치하지 않는 경향을 보였다고 하였다. 그러나 haloxyfop-methyl 처리시 콩과 yellow foxtail의 幼苗, callus 및 懸濁培養 細胞에서 藥害 反應은 정상관을 보였으며,<sup>1)</sup> 細胞培養에서 除草劑 代謝는 幼苗와 유사하다는 보고<sup>7,25,36)</sup>도 있다.

細胞의 懸濁培養은 방사선 동위원소로 표시된 除草劑를 사용하여 除草劑의 作用機作,<sup>1,4,37)</sup> 細胞內 代謝過程, 代謝場所 등<sup>28)</sup>의 구명, 除草劑 毒性에 따른 電氣傳導度, 生存細胞의 乾物重이나 相對性程度 등의 生產母數 推定에 의한 耐性 差異<sup>5,30)</sup>에도 이용되고 있다.

權<sup>19)</sup>은 oxyfluorfen이 첨가된 액체배지에서 細胞의 懸濁培養 결과,抵抗性 벼品种이 感受性 벼品种보다 細胞 生存率이 높았다고 하였는데 이것은 Guh 등<sup>13)</sup>도 같은 경향을 보고한 바 있다. Pornprom 등<sup>26)</sup>은 oxyfluorfen에 耐性 콩의 cell line이 보통의 cell line보다 oxyfluorfen의吸收가 적었다고 보고하였다.

갈퀴덩굴(*Galium aparine*)의 mesophyll로부터 protoplast를 분리하여 oxyfluorfen에 대한 生理活性 변화를 조사한 결과, protoplast의 viability는 처리 후 2시간 이상시 민감하나, intactness는 영향을 받지 않았다고 하였다.<sup>6)</sup> 따라서 특정 除草劑의 耐性植物 선발과 生理活性 機作의 이해를 위해서는 식물체의 器官·細胞·細胞內分子構造까지의 단계적인 검토가 이루어져야 할 것이다.

본 연구는 유효수준에서 oxyfluorfen에 내성 및 감수성으로 선발한 벼품종과 감수성 퍼를 공시하여 식물체의 환경적 변이 및 환경에 의한 형태적 변이의 영향이 서로 다른 즉 callus, 단세포 및 protoplast 수준에서 생리활성 차이를 비교하고자 하였다.

## 材料 및 方法

### 1. In vivo 耐性 反應

벼 400品種을 공시하여 유효조건(암상태, 광상태), 엽령(발아기, 1엽기, 3엽기) 및 처리방법(침지처리, 경엽처리)을 각각 달리하여 oxyfluorfen을  $10^{-7}$ ~ $10^{-3}$ M 농도로 처리하여 既히 달관평 가하여 얻은 耐性 벼 3品種(Baru, Hawon, Hunan 31)과 感受性을 보였던 벼 4品種(HP857, HP907, HP1033, Weldpally) 및 感受性이었던 雜草種 퍼를 대조로 사용하였다.

이들 종자를 침종 최아시켜 1엽기까지 유효한 幼苗에 oxyfluorfen을 처리하였다.  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  및  $10^{-3}$ M로 조제된 oxyfluorfen에 2시간 동안 식물체 전체를 침지처리한 후 세척하여 vermiculite로 충진된 종이컵에 이식하여 光條件( $79.8 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ )에서 5일간 생육시킨 후 耐性과 感受性 식물들간에 초장과 지상부의 생체중 차이를 조사하고 50% 생장억제 농도( $I_{50}$ )를 구했다.

### 2. In vitro 耐性 反應

#### 가. Callus 培養

종자의 頸을 제거한 玄米와 퍼 종자는 95% ethanol에 10초 동안 멸균하고 10시간 동안 흐

르는 물에서 세척한 후 다시 70% 알코올에서 5초 동안 소독하고 3% sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 50분 동안 소독한 다음 멸균수로 3회 세척하였다.

공시식물의 callus 유기를 위한 배지는 MS (Murashige & Skoog) 고체배지<sup>23)</sup>를 사용하였으며, 첨가된 생장조절제는 2,4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid) 2mg/l과 sucrose 30g/l를 넣어 pH5.8로 조정한 후 agar 8g/l을 넣고 250ml의 삼각 플라스크에 50ml씩 분주하여 120°C에서 15분간 멸균시켰다. 멸균한 배지에 소독한 각 공시식물의 玄米 및 퍼 종자를 10개씩 치상하여 광도  $26.6 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ , 광주기 16:8시간, 온도  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지된 배양실에서 배양하였다.

Oxyfluorfen을  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ M 농도로 처리 후 callus 生長量은 除草劑 함유 배지에 치상하기 전의 callus의 생체중과 20일 후의 생체중을 조사하여 생체중 증가로 표시하였으며, 또한 딜관평가(callus 신선도 또는 색깔)에 의한 callus 활력정도를 조사하였다.

#### 나. 單細胞 培養

懸濁培養에 사용한 callus는 MS 고체배지에서 誘起하여 3회 繼代培養시킨 friable한 500mg 정도를 가볍게 분쇄한 다음  $100 \mu\text{M}$ 의 sieve를 사용하여 분리되지 않은 殘在를 제거하고 여과된 것은 MS 액체 배지가 들어있는 삼각 플라스크에 접종한 다음 진탕배양기( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , dim light, 120rpm)에서 수회 繼代培養시켰다.

繼代培養은 細胞生長이 안정기(stationary phase)에 이르는 배양후 8일에 실시하였고, 繼代培養後 細胞生長이 대수기(log phase)에 해당하는 배양후 2일째에 삼각 플라스크 당 oxyfluorfen을 0,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  및  $10^{-3}$ M 농도별로 3반복으로 처리하였다.

細胞 生長率 조사는 2일 간격으로 12일까지 血球計를 사용하여 측정하였으며, 생장량은 처리 후 7일에 細胞 乾物重을 조사하여 무처리에 대비한 백분율로 환산하였다.

#### 다. 原形質體 培養

생장상(온도:  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , 광도:  $79.8 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ )

에서 6일간 육묘한 공시식물을 1mm 이하로 잘게 절단하여 Manitol이 함유된 CPW 용액(CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 148mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 27mg, KNO<sub>3</sub> 101mg, MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 246mg, KI 0.16mg, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.025mg, MES 980mg/l, pH5.8)에서 1시간 pre-plasmolysis 후細胞 및原形質體洗滌溶液(CPW)을 제거하고酵素溶液으로 교체하여 1시간 동안暗狀態로 유지하고 그 후 80rpm(55mm petri dish)으로 25°C暗狀態에서 3~7시간 배양시켰다. 배양 후 53 μm sieve로 걸러내어 pellet를 CPW 용액에 넣고 80g로 2회 원심분리하여酵素溶液을 세척하였다. 획득한原形質體는 1M sucrose 용액이 들어있는 실험관 상단에 넣고 60g로 원심분리하여 순수한原形質體를 수집하였다. 수집한原形質體는 다시 CPW 용액으로 80g로 원심분리하여 sucrose 용액을 제거하였다.

酵素溶液의 조성은 CPW 용액 10ml, 0.7M manitol, 1%(w/v) Cellulase O-RS(Yakult Honsha, Tokyo) 및 0.1%(w/v) Pectolyase Y-23(Seishin Pharmaceutical 5, Tokyo)를 pH5.8로 조정하였다. 이酵素溶液에 벼는 7시간, 피는 3시간 배양시켜原形質體를 분리하였다.<sup>16)</sup>

분리된原形質體는 oxyfluorfen 0, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>M의 농도로 처리하고 1, 2시간후에原形質體의 viability와 intactness를 조사하였다.

**Table 1.** Oxyfluorfen concentration( $I_{50}$  M) causing 50% inhibition of the growth of preselected plants to oxyfluorfen by *in vivo* test.

Species	$I_{50}$ (M)
	Tolerant
Rice	
Baru	$8.3 \times 10^{-4}$ (±2.3)
Hawon	$4.0 \times 10^{-4}$ (±2.4)
Hunan 31	$1.9 \times 10^{-4}$ (±1.0)
<hr/>	
Susceptible	
Rice	
HP857	$5.8 \times 10^{-6}$ (±2.0)
HP907	$7.6 \times 10^{-6}$ (±1.2)
HP1033	$7.5 \times 10^{-6}$ (±1.8)
Weldpally	$7.3 \times 10^{-6}$ (±3.0)
Barnyardgrass	$7.0 \times 10^{-6}$ (±2.8)

었다.

Viability는 fluorescein diacetate(FDA)를 사용하였는데螢光物質인 FDA 5mg을 acetone 1ml에 녹인 후 10ml CPW 용액에 100 μl FDA 용액을 희석하여螢光顯微鏡下에서 관찰하였다. Viability는 나출된 총原形質體 중 녹색의 형광을 발하는原形質體의 수를 세어 백분율로 계산하였으며, 또한 각식물간viability가 상이하므로 무처리에 대비한 백분율로 환산하였다.

原形質體의 intactness는 haemacytometer의 5 grid에 존재한原形質體數를 세어 결정했으며 무처리에 대비하여 백분율로 환산하였다.

## 結果 및 考察

### 1. *In vivo* 耐性反應

既히 선발된耐性 벼 3品種과感受性 벼 4品種 및 피의oxyfluorfen에 대한 50% 생장억제농도는 표 1에서와 같았다. 즉, 이들 선발종의  $I_{50}$  농도는耐性 벼品种들에서  $1.8 \times 10^{-4} \sim 8.3 \times 10^{-4}$ M이고,感受性 벼品种들과 피에서  $5.6 \times 10^{-6} \sim 7.6 \times 10^{-6}$ M를 보여耐性種에서感受性種보다  $I_{50}$  농도가 33~109배 높았다.感受性 벼品种이나 피에비하여耐性 벼品种의生理活性이이처럼낮은원인으로는식물종별로분자수준에서耐性因子의有無,細胞壁또는식물체表皮構造,吸收·移行能力의차이,體內에서의代謝機能차이등에따른것으로예측된다.<sup>10)</sup> 본실험결과는이들요인들의누적복합적인결과로표현된것으로서oxyfluorfen에대한벼品种間의耐性차이가요인별로어느만큼분포하는지를파악할필요가있음을나타낸다.

耐性인벼는 $10^{-5}$ M처리에서부터식물체갈변현상과생육저해가있었으나,感受性벼는 $10^{-6}$ M처리에서도생육저해와갈변현상이심하게나타났으며, $10^{-5}$ 과 $10^{-4}$ M처리에서는식물체가거의고사하였다(사진 1). 또한, 유사한반응결과가생체중및초장에서도확인되었다(그림 1).耐性인벼品种들에서는처리농도가증가함에따라완만히감소하였으나,感受

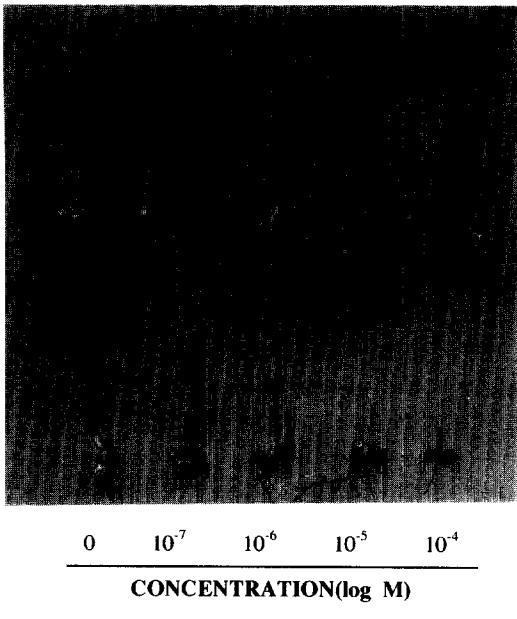


Plate 1. Comparison of growth inhibition of selected rice cultivars [A : Hunan 31, tolerant. B : HP907, susceptible] at 10 days after treatment of oxyfluorfen.

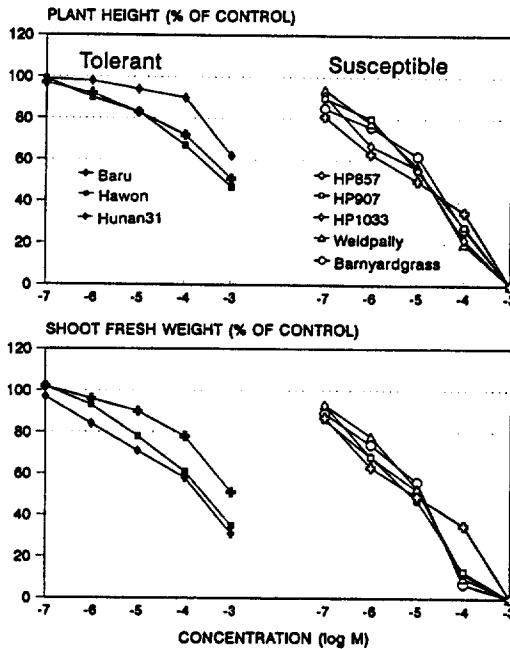


Fig. 1. Change in plant height and fresh weight of selected rice cultivars at 5 days after treatment by different *in vivo* concentrations of oxyfluorfen.

性 벼品种들과 편에서는 직선적으로 감소하였고 耐性種보다 감소폭도 유의적으로 커다. 즉 耐性 벼品种들은  $10^{-3}M$  처리에서도 무처리에 대비하여 30~42% 이상의 생육량을 보였으나, 感受性 벼品种들과 편에서는 식물체가 거의 고사하는 경향이었다.

이와 같은 결과는 oxyfluorfen에 대한 耐性品种이나 抵抗性品种育成에 의한 oxyfluorfen을 논에 사용할 수 있는 가능성을 시사하고 있다. 특히 DPE계인 chlornitrofen, chlormethoxyil, bifenoxy 등은 벼에 비교적 안전성이 높은 藥劑들로 알려져 있다.<sup>22)</sup> 그리고 柳<sup>40)</sup>가 보고한 바와 같이 oxyfluorfen은 벼 이양전 土壤混和 처리로, 또는 Prason과 Price<sup>27)</sup>의 결과와 같이 잡초발생전 처리로 사용 가능성이 있었으며, 具 등<sup>14)</sup>은 移秧畠에서 oxyfluorfen 分施處理를 하므로써 미량처리로도 편을 선택방제할 수 있어 사용전망이 밝음을 시사하였던 바 있다.

## 2. Callus 反應

Oxyfluorfen 耐性 및 感受性 식물들에서 유기한 callus(사진 2)에 oxyfluorfen을 처리한 후

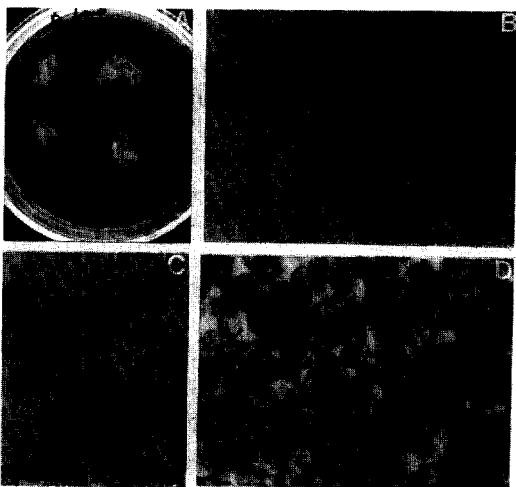


Plate 2. Callus, single cell and protoplast tested as experiment materials.

A : Rice callus

B : Rice cells cultured in suspension culture(x 400)

C : Isolated mesophyll protoplast of barnyardgrass

D : Isolated mesophyll protoplast of rice

callus 생장의 반응 결과는 표 2에 보인 바와 같다.

$10^{-7}$ 과  $10^{-5}M$  처리에서 耐性과 感受性種間에 callus 생장량은 *in vivo*에서보다 차이가 적었다. 그러나  $10^{-3}M$  처리에서 耐性인 벼品种들에

서는 무처리에 대비하여 callus 생장량이 89~71%를 보였던 반면, 感受性인 벼品种들과 피에서는 65~33%를 보여 耐性 벼品种들에서 callus 생장량이 17~38%가 많았다. 특히, 각 처리 농도에서 callus의 생장량이 적었던 식물은

Table 2. Growth response of 6-week cultured callus of material at 20 days after oxyfluorfen application.

Species	Concentration (M)	Number inoculated	Increase in fresh weight (mg/piece)	Growth index (% of control)
Tolerant				
<b>Rice</b>				
Baru	0	72	68	100
	$10^{-7}$	78	56	82
	$10^{-5}$	72	49	72
	$10^{-3}$	66	48	71
Hawon	0	54	81	100
	$10^{-7}$	60	72	89
	$10^{-5}$	72	62	77
	$10^{-3}$	60	52	76
Hunan 31	0	66	74	100
	$10^{-7}$	60	78	106
	$10^{-5}$	72	67	91
	$10^{-3}$	66	66	89
Susceptible				
<b>Rice</b>				
HP857	0	60	106	100
	$10^{-7}$	78	88	83
	$10^{-5}$	72	78	74
	$10^{-3}$	72	69	65
HP907	0	48	68	100
	$10^{-7}$	48	53	78
	$10^{-5}$	60	45	66
	$10^{-3}$	49	42	62
HP1033	0	60	114	100
	$10^{-7}$	66	84	74
	$10^{-5}$	60	78	68
	$10^{-3}$	60	68	60
Weldpally	0	46	59	100
	$10^{-7}$	40	45	76
	$10^{-5}$	52	37	63
	$10^{-3}$	30	32	54
Barnyardgrass	0	42	22	100
	$10^{-7}$	42	18	67
	$10^{-5}$	42	16	50
	$10^{-3}$	30	14	33

感受性인 벼 Weldpally와 피이었다.

따라서 본 실험의 경우, 幼苗 水準에서 oxyfluorfen의 耐性과 感受性種들은 callus 수준에서 서로 일치하는 경향이나 callus수준의 반응차이는 幼苗 水準만큼 크지 않았다. 이는 幼苗 와 callus의 解剖의 차이에 기인하는 感受性 回避機構의 영향이 있었을 것으로 보인다.

Zilkah 등<sup>41)</sup>은 11식물종의 幼苗와 callus에 광합성 저해 除草劑를 처리한 경우 callus의 생장저해와 幼苗에 대한 藥害는 직접적인 상관이 없다고 하였고, Nakamura<sup>24)</sup>는 벼의 選擇性 除草劑인 tetrapion에 대해 callus 생장저해와 幼苗의 生育저해는 일치하지 않는 경향이라 하였다. 그러나 haloxyfop-methyl 처리시 콩과 yellow foxtail 幼苗의 藥害와 callus의 生育저해 효과는 높은 상관관계를 보였다고 하였다.<sup>11)</sup> 權<sup>19)</sup>도 callus의 생존율은 정도의 차이는 있으나 대체로 耐性 벼品種이 感受性 벼品種보다 다소 높게 나타났던 것으로 보고하므로써 본 실험의 결과에서와 유사한 경향이었음을 알 수 있었다.

Callus 活力程度를 達觀評價(0~9, 9 : callus 活力 無, callus 색깔 : 검정)한 결과(표 3), 耐性

Table 3. Change in callus viability at 20 days after oxyfluorfen application.

Species	Viability*			
	Concentration(M)			
	0	$10^{-7}$	$10^{-5}$	$10^{-3}$
Tolerant				
Rice				
Baru	0	0	0	1.5
Hawon	0	0	0	2.5
Hunan 31	0	0	0	2.5
Susceptible				
Rice				
HP857	0	0	1.0	8.0
HP907	0	0	1.5	8.0
HP1033	0	0	0.5	7.0
Weldpally	0	0	1.0	8.2
Barnyardgrass	0	1	4.0	8.0

\* Visual rate 0-9, at 9 indicate no freshness with black color.

벼品種들은  $10^{-3}M$  처리에서 1.5~2.5 정도로 평가되었으나, 感受性 벼品種들과 피에서는 7.0~8.2 정도로 callus 活力이 거의 없었다.

### 3. 單細胞 反應

실험에 사용된 單細胞(사진 2)의 표준 生長率을 조사하기 위하여 치상후 單細胞 數를 조사한 결과는 그림 2과 같았다.

공시된 벼와 피는 oxyfluorfen의 반응정도에 관계없이 무처리의 細胞 生長曲線은 서로가 거의 같은 경향을 보였다. 즉, 배양초기에 잠복기(lag phase)를 거쳐 대수기(log phase)에 도달하였고, 배양 10일 정도에는 안정기(stationary phase)에 이르렀다. 따라서 oxyfluorfen 처리는 單細胞의 生理的活性이 가장 높은 대수기에 하였다.

幼苗에서 oxyfluorfen에 耐性 및 感受性이었던 벼品種들의 懸濁培養 細胞가 유묘에서와 같은 반응을 나타내는지 검정한 결과를 표 4에 나타낸 바와 같다.

#### CELL NUMBER

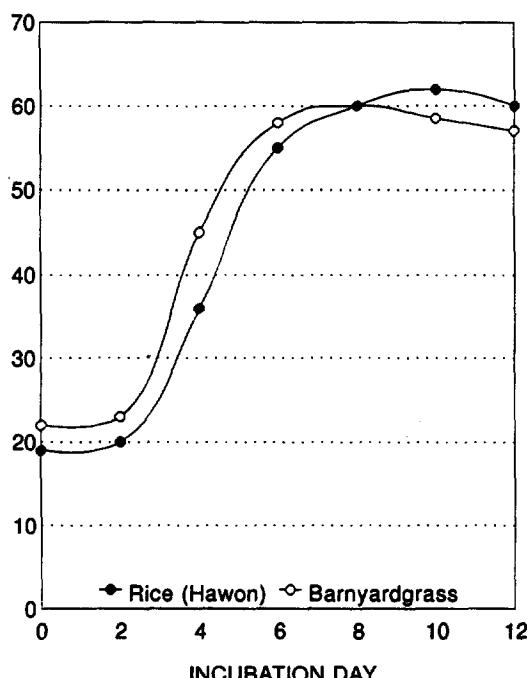


Fig. 2. Change in growth phase of cells under the suspension culture.

**Table 4.** Change in cell dry weight(% of control) of selected rice cultivars at 7 days of suspension culture under different concentration of oxyfluorfen.

Species	Concentration (M)				
	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Tolerant					
Rice					
Baru	102	95	92	91	86
Hawon	105	99	99	94	88
Hunan 31	110	105	94	91	83
Susceptible					
Rice					
HP857	95	93	91	89	82
HP907	97	95	91	86	81
HP1033	91	86	83	76	70
Weldpally	90	80	71	69	60
Barnyardgrass	81	71	68	60	56

**Table 5.** Change in viability(%) of isolated protoplasts from mesophyll cells of selected rice cultivars.

Species	Hours after isolation		
	0	1	2
Tolerant			
Rice			
Baru	95	94	90
Hawon	94	94	91
Hunan 31	92	91	91
Susceptible			
Rice			
HP857	94	95	92
HP907	94	93	88
HP1033	91	93	92
Weldpally	92	92	86
Barnyardgrass	91	89	75

感受性인 벼 HP857과 HP907의 細胞增殖은 耐性 벼品种들과 차이가 없었으나, 感受性인 벼 HP1033과 Weldpally 및 피는 각 처리 농도에서 耐性 벼品种들보다 細胞 生長率이 낮은 결과를 보였다.

대부분의 培養된 細胞는 光合成과 蒸散作用 및 物質轉移가 일어나지 않는 차이점이 있기 때문에<sup>31)</sup> 藥劑에 대한 耐性程度를 幼苗 水準과

동일한 수준에서 해석하기는 힘들 것으로 생각된다. 權 등<sup>19)</sup>은 oxyfluorfen이 첨가된 액체배지에서 耐性 벼品种들이 感受性 벼品种들보다 유의적으로 높은 細胞 生長率을 나타내었다고 하였고, 具 등<sup>13)</sup>도 耐性 벼品种들이 感受性 벼品种들보다 細胞 生長率이 높았다고 하였으며 본 실험에서도 일부 예외종을 제외하고는 전반적으로 耐性種들이 感受性種들보다 높은 細胞 生長率을 보이는 경향이 있다. 그러나 感受性 벼品种間에도 HP857, HP907의 두 品種과 HP1033, Weldpally의 두 品種 및 피에서는 單細胞 水準에서 感受性에 차이가 있음을 알 수 있었으며, 따라서 앞의 두 品種은 細胞壁이나 또는 細胞內 透過(浸透)性, 또는 細胞物質 組成의 차이를 보일 가능성이 있는 것으로 생각할 수 있다.

#### 4. 原形質體 反應

공식식물에서 분리한 原形質體의 viability(표 5)는 분리 후 0시간 91~95%, 1시간 89~95%, 2시간 75~90%로 oxyfluorfen에 대하여 서로 다른 感受性을 보였던 벼品种間 및 피에서도 비교적 有意差을 보이지 않았기 때문에 본 실험을 수행하는 데는 적합했던 것으로 생각한다. 이를 전형적으로 분리된 原形質裸出體는 사진 2에 제시하였다.

幼苗檢定에서 확인된 耐性과 感受性 벼品种 및 피로부터 原形質體를 裸出시켜  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  및  $10^{-3}$ M 농도로 oxyfluorfen을 처리한 후 1, 2시간에 viability를 평가한 결과는 표 6에서 제시한 바와 같다.

Oxyfluorfen  $10^{-7}$ ~ $10^{-4}$ M까지의 처리에서는 1, 2시간 경과로도 原形質體의 viability 변화가 적었으나,  $10^{-3}$ M 처리에서는 viability가 거의 소실되는 경향이 있다. 즉 耐性 벼品种들도 感受性 벼品种들이나 피에 비하여 모든 처리 농도에서 viability가 다소 높았을뿐 유의적인 큰 차이가 없었고, 특이하게 感受性인 벼 Weldpally 와 피에서만 다른 耐性 벼品种들보다 原形質體의 viability가 유의적으로 낮았다. 전반적으로 幼苗檢定에서 oxyfluorfen에 대한 耐性과 感

**Table 6.** Effect of oxyfluorfen on viability(% of control) of isolated protoplasts from mesophyll cells of selected rice cultivars.

Species	HAT*	Concentration(M)				
		$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$ M
Tolerant						
Rice						
Baru	1	99	100	94	92	2
	2	101	98	100	89	8
Hawon	1	96	97	93	90	4
	2	94	88	89	90	6
Hunan 31	1	100	100	102	100	10
	2	98	101	99	90	0
Susceptible						
Rice						
HP857	1	93	91	87	84	0
	2	85	86	83	78	0
HP907	1	96	93	93	91	0
	2	98	89	87	86	0
HP1033	1	98	97	95	89	0
	2	91	90	87	80	0
Weldpally	1	96	86	76	70	4
	2	92	85	69	56	0
Barnyardgrass	1	83	80	74	59	0
	2	61	55	53	30	0

\* HAT : Hours after treatment

受性을 보였던 벼品种間에도 뚜렷한 반응 차이가 原形質體 처리에서는 별로 나타나지 않았다.

그러나 原形質體 裸出後, 각 농도별로 oxyfluorfen 처리 후 1시간에 intactness를 검정한 결과는(표 7),  $10^{-7}$ 과  $10^{-6}$ M 처리에서는 耐性과 感受性種들간에 큰 차이가 없었으나,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  및  $10^{-3}$ M 처리에서는 耐性 벼品种들이 무처리에 대비하여 각각 98~93%, 95~88% 및 90~49%를 보였고, 感受性 벼品种들과 畦에서는 각각 86~61%, 81~53% 및 29~17%를 보임으로써, 耐性 벼品种들이 각 농도별로 12~32%, 14~35% 및 32~61%정도 높았음을 인정할 수 있었다.

처리 2시간 후의 intactness에서도 처리 후 1시간과 마찬가지로 耐性 벼品种들이 感受性 벼品种들이나 畦보다 높았다.

**Table 7.** Effect of oxyfluorfen on intactness(% of control) of isolated protoplasts from mesophyll cells of selected rice cultivars.

Species	HAT	Concentration(M)				
		$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Tolerant						
Rice						
Baru	1	95	94	93	88	49
	2	102	89	84	86	35
Hawon	1	98	99	96	95	66
	2	98	96	95	90	65
Hunan 31	1	109	105	98	94	90
	2	103	99	95	91	35
Susceptible						
Rice						
HP857	1	91	90	86	81	26
	2	94	89	80	81	29
HP907	1	91	91	86	74	29
	2	108	90	86	74	34
HP1033	1	90	86	70	53	17
	2	101	73	70	62	12
Weldpally	1	91	89	76	74	28
	2	87	77	71	58	21
Barnyardgrass	1	94	82	61	60	35
	2	85	78	59	50	23

갈퀴덩굴(*Galium aparine*)의 mesophyll로부터 분리한 原形質體에 acifluorfen을  $10^{-4}$ M로 처리 후 2시간에 intactness는 영향이 없었으나,<sup>6)</sup> 본 연구에서는 oxyfluorfen을  $10^{-7}$ ~ $10^{-4}$ M 처리에서 영향이 적었으나,  $10^{-3}$ M 처리에서 原形質體의 intactness를 감소시키는 것으로 나타났다. 즉 細胞壁이나 細胞內 物質의 간섭을 제거한 原形質體에서의 耐性·感受性間 반응 차이는 거의 소실되는 점으로 보아 oxyfluorfen에 대한 品種間 및 植物種間 耐性 차이는 原形質體 내에 존재하는 요인보다 原形質에 이르기까지의 수많은 解剖的 보호기능에 폭넓게 산재할 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

## 摘 要

400여 벼品种과 다수의 잡초종들로 부터 oxyfluorfen에 대하여 耐性 및 感受性으로 선발

된 벼 7品种과 피를 공시하여 이들의 oxyfluorfen에 대한 幼苗, callus, 單細胞 및 原形質體의 반응 결과를 체계적으로 비교함으로써 耐性 및 感受性 요인의 소재와 분포현상을 파악하고자 하였다.

1. Oxyfluorfen에 대한 既 선발 벼品种 및 피의  $I_{50}$  검정결과는 既 선발기준과 유사하게 확인되었다. 즉 耐性 벼品种의  $I_{50}$ 은  $10^{-4}M$  前後였고, 感受性 벼品种과 피는  $10^{-6}M$  前後로 유의적 차이를 보였다.
2. 耐性 및 感受性 식물들에서 誘起한 callus에 oxyfluorfen 처리 후 callus 생장량은 耐性 벼品种들에서 感受性 벼品种들과 피보다 많았으나 幼苗檢定 경우보다 차이는 적어지는 경향이었다.
3. Oxyfluorfen 처리 후 懸濁培養의 細胞 生長率은 耐性 벼品种들이 感受性 벼品种인 HP1033, Weldpally와 피보다 높았다.
4. Oxyfluorfen 처리 1, 2시간 후 原形質體의 viability는 耐性 벼品种들이 感受性 벼品种 Weldpally와 피에서만 높았을 뿐, 그 밖의品种들에서는 차이가 없었다. 그러나 原形質體의 intactness는 耐性 벼品种들이 感受性 벼品种들과 피보다 높았다.

### 引用文獻

1. Buhler, D.D., B.A. Swisher and O.C. Burnside. 1985. Behavior of C<sup>14</sup>-haloxyfop methyl in intact plants and cell cultures. Weed Sci. 33 : 291-299.
2. Chaleff, R.S. and T.B. Ray. 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. Science 223 : 1148-1151.
3. 崔根元. 1982. Mulching과 除草劑 lasso 및 goal 處理가 雜草生育 및 고추의 生育과 收量에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 碩士學位論文 p. 31.
4. Cho, H.Y., J.M. Widholm and F.W. Slite. 1986. Effects of haloxyfop on corn(*Zea mays*) and soybean(*Glycine max*) cell suspension cultures. Weed Sci. 34 : 496-501.
5. David, G.D., L.S. Rosa and A.D. Joan. 1984. A comparison of various growth parameters of cell suspension cultures to determine phytotoxicity of xenobiotics. Weed Sci. 32 : 235-242.
6. Derrick, P.M. and A.H. Cobb. 1987. The effects of acifluorfen on membrane integrity in *Galium aparine* leaves and protoplasts. British Crop Protection Conference - Weeds : 997-1004.
7. Dusky, J.A., D.G. Davis and R.H. Shimabukuro. 1980. Metabolism of diclofop-methyl in cell suspensions of diploid wheat. Physiol. Plant. 49 : 151-156.
8. 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. P.171.
9. Gajraj, Singh., K.P. Singh and V.C. Pandy. 1982. Effect of weedicides on weed control and yield in onion. Pesticides. 16(10) : 9-12.
10. Gawronski S.W. 1983. Tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars to metribuzin. Weed Sci. 31 : 525-527.
11. Gorske, S.F. and H.J. Hopen. 1979. Selectivity of nitrofen and oxyfluorfen between portulaca oleracea ecotypes and two cabbage(*Brassica oleracea* Var, Capitata) cultivars. Weed Sci. 26 : 640-642.
12. Grabowski, J.M. and H.J. Hopen. 1984. Evaluation of oxyfluorfen formulations for cabbage weed control. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109 (4) : 539-543.
13. Guh, J.O., Y.M. Lee, and Y.J. Kim. 1988. *In vitro* responses of rice cultivar to oxyfluorfen and bensulfuron-methyl. Korean J. Breed 20(4) : 306-313.
14. 具滋玉·鞠龍仁·千相旭·金東均. 1990. 數種 結合劑形으로 부터 Oxyfluorfen의 放出制御研究. I. 畜 條件에서의 放出速度模

- 型 研究. 韓國雜草誌 10(3) : 202-206.
15. 具滋玉 · 李榮萬. 1988. Oxyfluorfen 및 Ben-sulfuron에 대한 耐性 水稻 品種의 選拔. 全南大學校 論文集. 11-28.
16. Gupta, H.S. and A. Pattanayak. 1993. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of rice(*Oryza sativa* L.). Bio/Technology 11 : 90-97.
17. Jousseaume, C. 1981. Goal(R) a new herbicide for garlic and onions. p.9
18. Jung, J.W., K.B .Youn, J.T. Jo and Y.J. Song. 1983. Studies on the selection of effective herbicides in polyethylene film mulching culture of garlic(*Allium stirum* L.) Kor. J. Weed Sci. 3(1) : 105-110.
19. 權美羅. 1992. 벼 品種의 葉切片과 培養細胞 處理에 의한 oxyfluorfen 抵抗性 檢定 및 遺傳分析. 全南大學校 碩士學位 請求論文. p.49.
20. Lee, Y.M., H.H. Park, and K.H. Lee. 1987. Selection of variants in callus culture of rice in the presence of herbicide, Korean J. Breed. 19(1) : 28-31.
21. 李增周. 1992. 光要求型 ジフェニルーテル系 除草剤の選択作用 機構に 關する研究. 日本 博士學位 論文 p.156.
22. 李漢圭. 1988. 녹밭잡초의 發生現況과 防除 對策. 植物保護와 調節 3 : 62-86.
23. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15 : 473-497.
24. Nakamura, K. 1984. The effect of tetrapion on the growth and organ formation of rice callus. Weed Res. Japan. 29 : 110-115.
25. Oswald, T.H., A.E. Smith and D.V. Phillips. 1978. Phytotoxicity and detoxification of metribuzin in dark-grown suspension cultures of soybean. Pestic. Biochem. Physiol. 8 : 73-83.
26. Pornprom T., H. Matsumoto, K. Usui and K. Ishizuka. 1994. Absorption and metabolism of oxyfluorfen in tolerant soybean cells. Weed research, Japan. 39(3) : 180-182.
27. Prasan V. and C.E. Price. 1987. Weed control in rice-soybean rotation. Proc. 11th APWSS : 159-163.
28. Rafii, Z.E., F.M. Ashton and R.K. Glenn. 1979. Metabolic site of action of fluridone in isolated mesophyll cells. Weed Sci. 27 : 422-426.
29. Roberts, H.A., W. Bond and J.M. Dudley. 1982. Herbicide evaluation. In Annual Report. National Vegetable Research Station, VK Warwich, p.133-134.
30. Sato, F., T. Satome and Y. Yamada. 1987. A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic photomixotropic and heterotrophic cultured tomato cells and seedlings. Plant Cell Reports. 6 : 401-404.
31. Schlesselman, J.T. 1982. The use of oxyfluorfen in onions. In proceedings of the western society. Weed Sci. 35 : 54-60.
32. South, D.B. 1982. Relationship between amount of epicuticular wax and activity of oxyfluorfen on sweetgum leaves. Proc. 35th Ann. Meet. S. Weed Sci. Soc. 82 : 245
33. Swanson, E.B., M.P. Coumans, G.L. Brown, J.D. Patel and W.D. Beversdorf. 1988. The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after *in vitro* selection of microspore and protoplasts. Plant Cell Rep. 7 : 83-87.
34. Thomas, B.R. and D. Pratt. 1981. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* L. and *peruvianum* via embryo callus. Theor. Appl. Genet. 59 : 215-219
35. 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 : 89-92.
36. Vantone, D.E. and E.H. Stobbe, 1979. Light

- requirement of the diphenyl herbicide oxyfluorfen. Weed Sci. 27 : 88-91.
37. Watson, M.C., D.G. Bartels, and K.C. Hamilton. 1980. Action of selected herbicides and tween 20 on oat(*Avena sativa*) membranes. Weed Sci. 28 : 122-127.
38. Yen, S.T. and K. Sadanage. 1977. Inheritance of leaf peroxidase in oats. Can. J. Genetic Cytol. 19 : 303-312.
39. Yih, R.Y. and C.S. Enbank. 1975. New potential diphenyl ether herbicides. J. Agric. Food Chem. 23 : 592-593.
40. 柳芳和. 1980. Oxyfluorfen. 除草劑 解說(1) 雜草研究(日). 25-1 : 48-62.
41. Zilkah, S. and J. Gressel. 1977. Cell cultures vs. whole plants for measuring phytotoxicity. Plant Cell Physiol. 18 : 641-655.