

Oxyfluorfen에 대한 耐性 및 感受性 벼品種의 生理活性 機構

Ⅲ. Protoporphyrinogen oxidase(Protox)活性과 Protoporphyrinogen IX(PPIX) 蓄積*
鞠龍仁** · 具滋玉** · 全載哲***

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

Ⅲ. Differential Protoporphyrinogen Oxidase(Protox) Activity and Protoporphyrinogen IX(PPIX) Accumulation*
Kuk, Y.I.** , J.O. Guh** and J.C. Chun***

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the inhibition of protox activity and the PPIX accumulation of the oxyfluorfen-tolerant and-susceptible rice cultivars with barnyardgrass, a typical susceptible weed in accordance by oxyfluorfen treatment.

The susceptible rice cultivars and barnyardgrass showed more inhibition of protox activity due to the treatment of oxyfluorfen than the tolerant rice cultivars. Especially in the concentration at $10^{-6}M$ treatment, protox activity of the susceptible rice cultivars and barnyardgrass were the completely inhibited but the tolerant rice cultivars kept 32~59% of activity compared to the control.

As the treatment concentration increased, the content of PPIX accumulation increased and it increased untill four hours of light exposure but it tended to decrease these after. The content of PPIX accumulation by the treatment of oxyfluorfen was more pronounced in the light condition than in the dark. Under the light and dark conditions, the susceptible rice cultivars and barnyardgrass showed more PPIX accumulation than the tolerant rice cultivars. Especially the susceptible barnyardgrass had more than the rice.

With the treatment of GC and DA, tetrapyrrole biosynthesis inhibitor, the herbicidal activity by oxyfluorfen was inhibited, and the susceptible rice cultivars and barnyardgrass tended to have less effective than the tolerant rice cultivars and the content of chlorophyll or PPIX accumulation tended to be similar.

Key words : Oxyfluorfen, tolerance, rice, protoporphyrinogen oxidase, protoporphyrinogen IX

* 본 연구는 한국과학재단 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부임.

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

*** 全北大學校 農科大學(College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea)

<1996. 2. 5 접수>

緒 言

DPE계 화합물은 光活性에 관여된 機作에 관하여 여러가지 상반된 보고^{1,9,31)}가 있었으나, 현재에는 DPE계 除草劑의 protox의 저해 → PPIX 蓄積 → 一重項酸素 分子의 生成 → 膜의 過酸化라고 하는 活性 發現의 과정이 정설로 받아들여지고 있다. 이 과정에서 DPE계 除草劑의 作用點은 protox로 이 酵素^{10,11,12,13,21,22,26,28)}는 엽록소 生合成 과정에서 protoporphyrinogen IX(protogen IX)을 PPIX으로 산화하는 酵素이다. Protogen의 저해에 의해 protogen이 PPIX으로 산화되지 못하고 蓄積이 되며, 蓄積된 protogen은 plastid의 합성 장소로부터 細胞質로 이탈되며, 이탈된 protogen은 非酵素的인 자동산화에 의해 PPIX으로 산화 蓄積된다. 이렇게 蓄積된 PPIX은 빛에 의해 勵起되면서 산소와 반응하여 singlet oxygen을 생성하고, 이 singlet oxygen이 膜을 이루고 있는 불포화 지방산을 산화시켜 過酸化 脂質을 형성하므로써 植物 細胞膜을 파괴하는 것으로 알려져 있다^{24,34)}.

Matringe 등²⁵⁾은 DPE계 除草劑인 acifluorfen methyl(AFM)을 처리한 콩의 培養細胞에서 엽록소 生合成 中間체인 tetrapyrrol 구조를 갖는 PPIX이 異常蓄積되는 것을 발견하였고, 또한 intact 식물에서도 DPE계^{10,14,18,19,22,23,30,35,38)} 뿐만 아니라 DPE계와 유사한 구조를 갖는 oxadiazon⁶⁾에서도 PPIX이 異常蓄積되는 동일한 결과를 발견하였으며, 이와 같은 PPIX의 蓄積程度는 除草活性, 細胞內 被害 및 電解質 漏出과 매우 높은 상관^{7,8,36,38)}이 있음을 알게 되었다.

DPE계 除草活性에 효과적인 光波長과 PPIX 吸收波長이 일치하는 것으로 보아 PPIX이 活性酸素 생성의 원인물질^{5,10,17)}로 추정되었으며, PPIX는 광증감 반응에 의해 강한 산화력을 갖는 活性酸素인 一重項酸素(1O_2)를 발생시키는 성질이 있으므로⁴⁾, 그 蓄積은 膜脂質 등을 過酸化시키는 원인이 되는 것으로 생각되었다. Matringe 등²⁵⁾과 Witkowski 등³⁹⁾은 PPIX 蓄積의 원인으로서 protogen으로부터 PPIX으로 산화를

촉매하는 酵素인 protox가 매우 낮은 농도의 AFM에 의해 저해되는 것을 발견하였다. PPIX이 DPE계 除草劑의 원인물질 여부를 알아보기 위해 tetrapyrrole 生合成 抑制劑^{6,8,23,29)}인 levulic acid, gabaculine과 4, 6-dioxoheptanoic acid를 오이 줄기에 15시간 동안 전처리했을 때 oxyfluorfen의 活性이 강하게 억제되었고, 다른 DPE계 뿐만 아니라 oxadiazon에서도 같은 경향을 보임으로써 PPIX이 DPE계 生理活性 物質이라 하였다.

Protogen은 chlorophyll과 heme 生合成 경로에서 공유되는 마지막 단계의 酵素로 膜結合性이며, chloroplast envelope 및 thylakoid membrane과 결합한다²⁶⁾. Photobleaching 除草劑인 cyclic imide, oxadiazon, LS820340, RH5348, pyrazole phenyl ether, 3-alkyl 및 3-alkoxy-5-aryloxybenzisothiazole 등도 protogen 活性를 억제한다고 보고^{2,3,7,8,37)}되었다. 옥수수 및 오이의 etioplast에서 추출한 protogen은 DPE계 除草劑인 AFM에 대하여 I_{50} 농도가 4nM 및 30nM로 극히 낮은 농도이며, 이와 유사한 결과가 감자, 효모, 쥐의 간 mitochondria 등³⁹⁾에서도 얻을 수 있었다. 또한 oxyfluorfen에 대한 벼, 오이, 밀, 무우에서 추출한 protogen의 I_{50} 농도는 *in vitro* 조건에서 1.4~30nM에 존재하고, *in vivo*에서도 무우와 오이 黃化植物體에 oxyfluorfen을 처리한 뒤 20분 이내에 50% 이상의 protogen 活性가 저해되는 것이 보고되었다²⁰⁾.

PPIX 蓄積은 protogen의 活性 억제에 기인되며^{21,32)}, DPE 除草劑인 chlornitrofen, nitrofen, chlomethoxynil, bifenoxy 및 oxyfluorfen 등은 PPIX 蓄積量이 서로 다르고³⁸⁾, PPIX 형성을 위해 산소가 없는 데서는, ATP, NADP, Mg^{2+} 및 L-methionine이 필요한 것으로 알려져 있다^{14,33)}. Acifluorfen에 耐性인 겨자는 PPIX이 적게 蓄積되고 반면에 感受性인 velvetleaf는 많은 양이 蓄積되며, PPIX 蓄積 이외의 耐性 차이는 代謝, 浸透 및 活性酸素 防禦系에 기인된다고 하였다³⁶⁾. 李²⁰⁾은 oxyfluorfen의 耐性 식물이 感受性 식물에 비해 除草劑 처리시 吸收量이 적으며, 抗酸化酵素 活性는 높다고 하였다.

따라서 본 연구는 oxyfluorfen에 대한 耐性 및 感受性 벼品種들과 感受性 피의 生理活性

차이를 작용점 효소인 protox 활성과 재초원인 물질인 PPIX 측정정도로 알아보기 위하여 수행되었다.

材料 및 方法

1. Protox 活性

a) Plastid 調製

前報¹⁶⁾와 동일한 공시재료를 vermiculite에 과중하고 25℃ 暗條件의 성장상에서 7일간 육묘한 다음 93.1 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ 光條件에서 5시간 녹화시킨 후 줄기부분을 잘라 plastid 조제에 사용하였다.

Plastid의 조제는 저온에서 각 식물체의 줄기를 유발에 넣고 sea sand를 첨가하여 마쇄하였다. 시료와 homogenization buffer(10mM Hepes, 330mM Sorbitol, 1mM EDTA, 1mM MgCl₂, 5mM Cystein pH 7.7 at 4℃)의 비율은 1 : 5로 하였다. 마쇄액은 8겹의 거즈를 사용하여 식물재료중의 섬유질을 제거하고 4℃에서 6,000g에서 1분간 원심분리하여 침전한 crude cell debris와 sea sand를 제거하였다. 상등액은 4℃로 6,000g로 15분간 원심분리하여 pellet을 얻고 assay buffer(10 mM Hepes, 330mM Sorbitol, 1mM EDTA, 1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF pH 7.7)를 첨가하여 재현탁시킨 후 얼음하에서 20초간 2회 초음파 처리한 다음, 단백질 함량이 2mg/ml가 되도록 재현탁하고 protox 活性的 측정전까지 -70℃에 보관하였다³⁷⁾. 단백질의 함량은 micro BCA 방법으로 측정하였고, 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

b) Protogen IX 合成

0.1M 20% EtOH-KOH에 녹인 50 μm PPIX 5ml에 3% Na-amalgam 5.5g을 분쇄하여 넣고 N₂ 가스로 치환시킨 후 마개를 닫고 4~5분간 세계 흔들어 반응시킴으로써 PPIX을 protogen IX으로 환원시켰다. 반응 후 0.22 μm filter로 여과하고, 여과액을 40% 인산을 사용하여 pH 8.0~8.5로 맞춘 후 DTT의 최종 농도가 2mM 이 되도록 첨가하여 -70℃에 보관하고 2시간 이내에 사용하였다. 이렇게 얻어진 protogen은

50 μM 의 농도가 된다³⁷⁾.

c) Protox 活性 測定

酵素反應液(2000 μl)의 조성은 각각 plastid(2 mg/ml protein) 200 μl , EtOH에 용해된 각 농도의 除草劑($10^{-9} \sim 10^{-5}\text{M}$) 2 μl , protogen을 함유한 assay mixture 1,798 μl 이었다.

Assay mixture는 100mM Hepes, 5mM EDTA, 2mM DTT, 1% Tween 20, 10 μM 의 protogen으로 조성되었다. 이들 酵素反應液은 30℃에서 30분간 반응시켰으며, PPIX 농도는 螢光 分光光度計(Kontron SFM 25 Swiss)를 사용하여 勵起波長 395nm, 螢光波長 626nm의 조건으로 2분간 측정후 표준 PPIX의 농도와 비교하였다.

Protogen의 非酵素的인 산화에 의한 PPIX의 생성을 측정하기 위하여 90℃로 20분간 가열한 plastid를 사용하였으며, 藥劑 농도 증가에 따른 非酵素的 PPIX의 蓄積量은 무처리 수준으로부터의 증가량으로 品種間을 비교하였다. Protox의 活性은 생성된 PPIX의 量에서 非酵素的 酸化로 생성된 PPIX의 量을 減하여 계산하였다³⁷⁾.

2. PPIX 蓄積量

공시식물은 暗條件의 성장상(25℃)에서 1주일간 자란 幼苗 전체를 1 μM oxyfluorfen 용액에 2시간 30분 동안 침지처리 후 光에 1시간 간격으로 6시간 동안 노출하여 시간 경과에 따른 PPIX 蓄積量을 조사하였고, 또한 光·暗條件에서 각각 2, 4, 6시간 경과시킨 후 PPIX 蓄積量을 측정하였다. 이 때 光은 93.1 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ 로 照射하였다. 소정의 시간에 PPIX 정량을 위해 줄기부분을 채취하여 시료로 사용하였다. PPIX 추출 및 분석은 Duggan과 Gassman 방법⁵⁾을 약간 변형시켜 수행하였다. 저온에서 각 식물의 줄기부분 0.5g에 acetone+0.1M NH₄OH (9 : 1 V/V) 10ml를 첨가하여 마쇄한 후, 8,000g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 同量의 n-hexane으로 分割한 후 n-hexane 층을 버리고 acetone 층에 diethyl ether 2ml, 飽和 NaCl 0.5 ml, 0.5M NaH₂PO₄(pH 2.5) 0.45ml을 넣어 추출

하였다. Diethyl ether 추출물은 소량의 Na₂SO₄로 수분을 제거한 후 40℃에서 減壓蒸溜하여 diethyl ether를 건조시킨 다음 methanol 2.5ml로 녹여 螢光 分光光度計(Kontron SFM 25, 30℃, Ex 400nm, Em 633nm)로 분석하였다.

3. Tetrapyrrole 生合成 抑制劑 效果

공시식물은 oxyfluorfen에 耐性인 벼 Hawon과 感受性인 벼 Weldpally 및 피로서 각각 최아시켜 vermiculite에 파종하고 10일간 육묘하여 뿌리를 세척한 후 1mM gabaculine(GC)과 4, 6-dioxoheptanoic acid(DA)를 뿌리에 처리하여 15시간 暗狀態에서 생육시킨 후 1μM oxyfluorfen에 2시간 동안 식물체 전체를 침지처리하고 光(93.1 μE · m⁻² · S⁻¹)에 6시간 노출시켜 chlorophyll 함량 및 PPIX을 분석하였다. Chlorophyll 함량은 80% acetone으로 추출하여 측정하였고, PPIX 분석은 앞의 실험2와 동일하게 수행하였다. 또한, 光露出 後 48시간에 지상부 생체중을 조사하였다.

結果 및 考察

1. Protox 活性 및 PPIX 蓄積

Protox의 活性은 protogen으로부터 酵素作用에 의해 산화된 PPIX의 蓄積量을 측정함으로써 구할 수 있었다. 暗狀態에서 생육된 oxyfluorfen

에 내성 벼 3品種과 感受性 벼 4品種, 피 etiolated 幼苗의 plastid에서 추출한 protox를 이용하여 oxyfluorfen 처리에 의한 酵素 活性의 저해를 조사하였다(표 1).

耐性 벼品種들보다 感受性 벼品種들과 피에서 oxyfluorfen 처리에 의한 protox 活性 저해는 컸으며, 특히 感受性 벼品種들과 피에서는 10⁻⁶M 처리에서부터 protox 活性이 완전 억제되었으나, 耐性 벼品種들에서는 32~59% 活性을 보였다. 그리고 무처리에 대비하여 protox 活性의 50% 억제 농도는 식물들간에 상이하나 感受性인 벼 HP1033, Weldpally와 피에서는 10⁻⁹M 정도이고, HP857 및 HP907은 10⁻⁸M 정도이었다. 그러나 耐性인 벼 Baru는 10⁻⁷M이고, Hawon, Hunan 31은 10⁻⁶M 이상이었다.

옥수수 및 오이의 etioplast에서 추출한 protox는 DPE계 除草劑인 acifluorfen-methyl에 대해 I₅₀ 농도가 각각 4nM과 30nM로서 극히 낮은 농도이었다^{27,39)} 이와 유사한 결과는 감자, 효모, 쥐의 간 mitochondria에서도 얻을 수 있었다³⁹⁾ 또한 oxyfluorfen에 대해 벼, 귀리, 메밀, 무우에서 추출한 protox에 대한 I₅₀ 농도는 in vitro 조건에서 1.4~30nM 범위에 존재하고, in vivo에서도 무우와 귀리의 黃化植物體에 oxyfluorfen을 처리하면 빠르게 酵素活性이 저해됨으로써 protox는 DPE계 生理活性의 作用點이거나 또는 작용기작과 관련성이 있을 것으로

Table 1. Effect of oxyfluorfen on protoporphyrinogen oxidase activity (% of control).

Species	Concentration (M)					
	0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ M
..... Tolerant						
Rice						
Hawon	100 (74)*	87	81	74	45	22
Hunan 31	100 (76)	95	87	75	59	38
Baru	100 (63)	87	64	49	32	20
..... Susceptible						
Rice						
HP857	100 (76)	73	48	19	0	0
HP907	100 (82)	79	58	15	0	0
HP1033	100 (89)	54	30	16	0	0
Weldpally	100 (56)	44	21	9	0	0
Barnyardgrass	100 (76)	49	25	6	0	0

* Numbers in parentheses are enzyme activity rate(n mol PPIX/min.mg protein) of the control preparations.

생각되고 있다²⁰⁾ 따라서 본 연구에서도 벼 품종間 무처리에 대비하여 50% 감소 농도에 차이가 있기는 하였지만, I_{50} 농도가 供試 品種들 간에 $10^{-9} \sim 10^{-6}M$ 까지의 큰 차이로 분포되어 있었기 때문에 앞에서와 같은 맥락으로 protox가 oxyfluorfen의 生理活性 정도 즉 耐性 및 感受性 發現機作的 作用點으로 생각되며, 식물에 대한 oxyfluorfen의 感受性 정도 차이는 protox 活性 저해 정도와 상관이 높은 것으로 생각되었다.

또한 protox의 활성 자체가 식물에 生理活性을 나타내지 않고, protox 활성이 저해됨으로써 protogen IX이 非酵素的으로 PPIX을 생성하여 singlet oxygen에 의한 peroxidation을 일으키는 것으로 연구되고 있다^{24,34)}. 따라서 oxyfluorfen 처리에 따른 PPIX의 蓄積程度를 무처리 기준으로 계산해 본 결과(그림 1), 내성인 Hunan 31은 oxyfluorfen $10^{-5}M$ 의 고농도 처리에서도 非酵素的 산화물인 PPIX 蓄積 증가량이 50nmole/mg protein 미만이었으나 감수성인 Weldpally는 $10^{-7}M$ 의 농도에서도 50nmole/mg protein의 높은 증가 경향을 보였다. 따라서 약제처리에 의한 protox의 활성 감소와 이로 인한 非酵素的 PPIX의 蓄積 증가는 藥劑의 生理活性 정도와 연관된다는 다른 보고들^{7,8,36,38)}과 본 실험, 즉 벼 품種間의 반응 차이에서도 인정할 수 있었다. 그러나 protox의 source가 plasma membrane과 etioplast의 두 곳으로 달리 존재하며 각각 藥劑

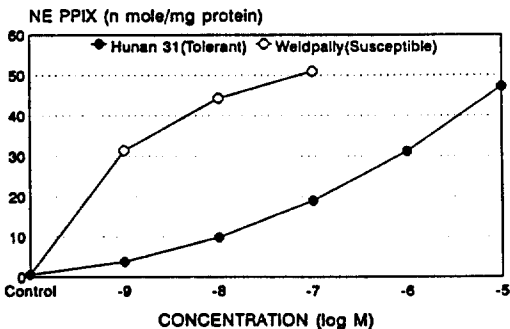


Fig. 1. Differential increasing of non-enzymatic(NE) PPIX accumulation in rice cultivars by concentration of oxyfluorfen [The initial PPIX at control were 76n mole in Hunan 31, and 56 in Weldpally, respectively.

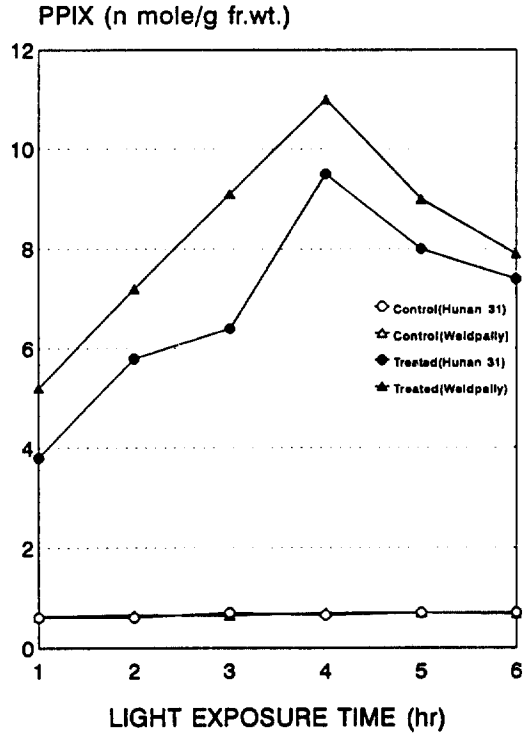


Fig. 2. Time course of accumulation of PPIX in oxyfluorfen treated rice cultivars during 6 hours under light exposure.

의 生理活性에 미치는 영향에 차이가 있다고 한다^{11,12,26)}. 본 연구의 경우에는 이들 두 source의 protox가 한꺼번에 추출되었기 때문에 재료 식물(벼품종)의 耐性 및 感受性 배경은 이들 두 source를 분리 조제하여 재확인하므로써 보다 명확하게 해석될 수 있을 것으로 생각된다.

2. 光·暗條件에서의 PPIX 蓄積量

Oxyfluorfen 처리 후 光露出 시간에 따른 PPIX 蓄積量을 조사하였다(그림 2). 耐性 벼 품種보다 感受性 벼 품種에서 PPIX의 蓄積量은 많았으나, 蓄積되는 pattern은 두 품種에서 비슷하게 光露出 4시간까지 증가하다가 4시간 이후 급격히 감소하는 경향을 볼 수 있었다. Shuich 등³⁸⁾의 보고에서도 PPIX 蓄積은 藥劑處理 4시간 후에 최고에 달하고 그 후 빠르게 감소한다고 하였는데, 본 실험에서도 같은 경향이었다. 그러나 Matsumoto 등²⁹⁾은 PPIX 蓄積量이 식물에 따라 oxyfluorfen 처리 후 2시간에 최고

에 달하고 그 후는 식물 조직이 過酸化되어 PPIX의 生合成 능력이 상실되며, 또한 PPIX이 過酸化되어 光分解되므로 시간이 경과됨에 따라 감소된다고 하였다. Acifluorfen-methyl도 처리 후 2시간에 PPIX 蓄積量이 거의 100배에 달한다는 보고³⁰⁾도 있어, PPIX 蓄積은 藥劑와 식물의 종류에 따라 달리 이루어질 수 있는 것으로 생각되므로 PPIX 蓄積시간과 感受性 차이는 보다 폭넓게 검토되어야 할 것으로 보인다.

耐性 벼 3品種과 感受性 벼 4品種 및 피에 대한 PPIX 蓄積量을 oxyfluorfen 처리 후 光·暗條件에서 2, 4 및 6시간 배양하여 조사하였다(표 2).

PPIX 蓄積量은 각 공시식물에서 暗條件보다 光條件에서 전반적으로 다소 많았다. 따라서 본 연구는 PPIX 蓄積量이 暗條件보다 光條件에서 많았다는 다른 보고들^{8,30,38)}과 일치하는 경향이였다. 이것은 光이 porphyrin 生合成 경로 즉, 엽록소 生合成系를 活性化하기 때문인

Table 2. Effects of oxyfluorfen(10^{-6} M) on protoporphyrin IX accumulation(n mole/g fresh weight).

Species	Incubation (Hours)	Light condition			Dark condition		
		C	T	T/C	C	T	T/C
.....Tolerant.....							
Rice							
Hawon	2	0.68	7.3	10.7	0.70	6.4	9.1
	4	0.80	9.5	11.9	0.70	7.8	11.1
	6	0.70	8.8	12.6	0.60	6.5	10.8
Baru	2	0.75	6.5	8.6	0.80	6.8	8.5
	4	0.80	9.5	11.9	0.80	7.6	9.5
	6	0.75	9.3	12.4	0.80	7.2	9.0
Hunan 31	2	0.60	5.8	9.7	0.60	3.9	6.5
	4	0.60	6.6	11.0	0.60	5.8	9.6
	6	0.80	8.4	7.8	0.80	4.0	5.0
.....Susceptible.....							
Rice							
HP857	2	0.60	7.0	11.6	0.55	6.5	11.8
	4	0.80	10.7	13.4	0.60	5.8	9.7
	6	0.70	9.2	13.1	0.60	5.7	9.5
HP907	2	0.60	8.5	14.2	0.56	7.6	13.6
	4	0.75	9.0	12.0	0.70	7.0	10.0
	6	0.70	8.2	11.7	0.58	5.7	9.8
HP1033	2	0.50	6.0	12.0	0.61	7.6	12.5
	4	0.68	9.4	13.8	0.70	7.3	10.4
	6	0.50	8.7	17.4	0.56	7.9	14.1
Weldpally	2	0.65	8.2	12.6	0.55	6.6	12.0
	4	0.65	9.4	14.5	0.60	8.5	14.2
	6	0.64	8.7	13.6	0.60	7.9	13.1
Barnyardgrass	2	0.20	4.3	21.5	0.25	4.8	19.2
	4	0.30	6.9	23.0	0.20	2.8	14.0
	6	0.35	5.3	15.1	0.20	3.0	15.0

* C: Control T: Treated T/C: Treated/Control

것으로 생각된다. 그러나 Lee 등¹⁹⁾은 oxyfluorfen 처리에 의한 PPIX 蓄積을 추적한 결과, 일부 식물종(메밀 등)은 暗條件에서 다량의 PPIX을 蓄積하며 光이 조사되면 蓄積된 PPIX이 活性酸素를 생성하므로 殺草活性이 크게 증진되는 것으로 보고하였으나, 빛은 식물에서 DPE계 除草劑에 의한 PPIX 蓄積에 필수적인 요건은 아니라고 하였다.

光條件下에서 무처리에 대비한 PPIX 蓄積량은 처리 후 耐性 벼品種들에서는 7.8~12.6배가 蓄積되고 感受性 벼品種들에서는 11.6~17.4배가 蓄積되었다. 暗條件下에서도 耐性 벼品種들은 5.0~11.1배가 蓄積되었으나 感受性 벼品種들에서는 보다 많은 9.5~14.2배가 蓄積되었다. 感受性인 피는 光 및 暗條件에서 각각 15.1~23.0배와 14.0~19.2배가 蓄積되어 비교적 높은 蓄積량을 보였는데, 벼는 비효율적 광합성계 식물(C₃)인 반면, 피는 효율적 광합성계 식물(C₄)이기 때문에 光露出 조건하에서의 oxyfluorfen 生理活性 반응이 컸을 것으로 해석되며, 유사한 특성에 대한 보고들^{15,19)}이 있다.

따라서 光·暗條件下에서 PPIX의 蓄積량은 耐性 벼品種들보다 感受性 벼品種들과 피에서 많았던 점으로 미루어 PPIX 蓄積량과 藥劑活性 사이에는 다소 높은 상관관계가 있었다. 앞의 다른 연구에서도 PPIX 蓄積량과 電解質 漏出 및 除草活性間에는 정의 상관^{7,36,38)}이 있고, acifluorfen에 耐性인 겨자는 PPIX이 적게 蓄積되었던 반면에 感受性 식물인 velvetleaf는 많이 蓄積된다고 하였는데³⁶⁾, 본 실험의 결과도 이와 일치하는 경향을 보였다. 그러나 Lee 등¹⁹⁾은 PPIX 蓄積량과 oxyfluorfen에 의한 藥害程度는 반드시 상관관계를 갖지는 않았다고 함으로써 이점 또한 폭넓은 연구가 요구된다고 하겠다.

3. Tetrapyrrole 生合成 抑制劑 效果

耐性 벼 Hawon과 感受性 벼 Weldpally 및 피를 10일간 육묘하여 tetrapyrrole 生合成 抑制劑인 gabaculine(GC)과 4, 6-dioxoheptanoic acid(DA)를 뿌리에 처리하고 暗狀態에 15시간 경

과시킨 후 10⁻⁶M의 oxyfluorfen(OF)에 2시간 침지처리하고 光에 노출시켜 생체중, chlorophyll 함량 및 PPIX 蓄積량을 분석하였다.

GC와 DA 처리에 의한 除草活性의 억제효과를 조사한 결과(그림 3), GC와 DA는 식물 생장에 별다른 영향을 주지 않았으나, oxyfluorfen과 혼합처리하면 藥劑의 除草效果가 감소되었는데, DA+OF 처리보다는 GC+OF 처리에서 oxyfluorfen 除草活性을 더 억제하였다. 植物種間의 oxyfluorfen 除草效果의 억제는 耐性인 벼 Hawon이 感受性 벼 Weldpally와 피에서 보다 더 뚜렷하게 나타났다.

Tetrapyrrole 生合成 抑制劑가 chlorophyll 함량

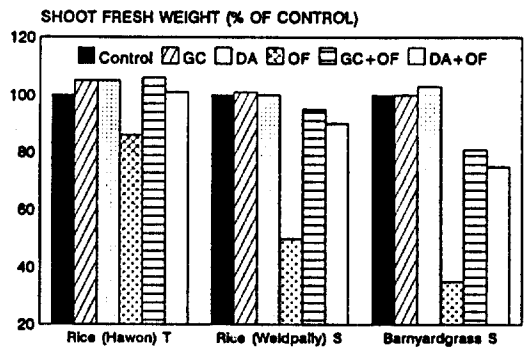


Fig. 3. Change in shoot fresh weight as affected by pre-treatment of gabaculine(GC) and dioxoheptanoic acid(DA) before oxyfluorfen(OF) treatment on selected plant species(T: Tolerant, S: Susceptible).

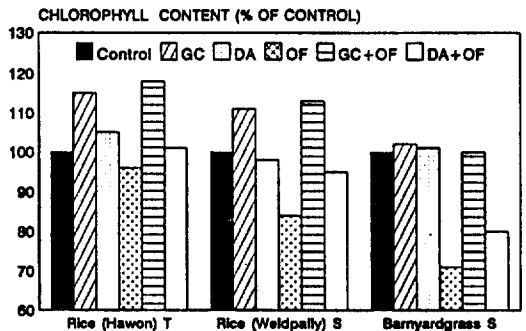


Fig. 4. Change in chlorophyll contents as affected by pre-treatment of gabaculine(GC) and dioxoheptanoic acid(DA) before oxyfluorfen(OF) treatment on selected plant species(T: Tolerant, S: Susceptible).

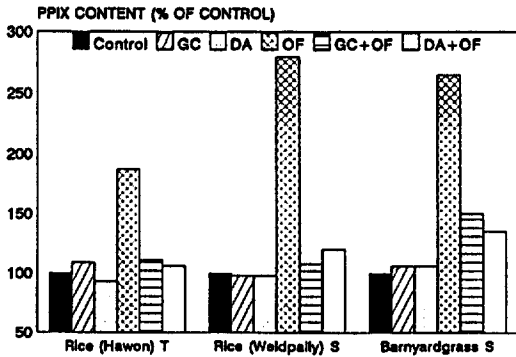


Fig. 5. Effects of gabaculine(GC) and dioxoheptanoic acid(DA) on oxyfluorfen(OF) induced PPIX accumulation from plant species.

에 미치는 효과를 조사한 결과(그림 4), GC 단독으로 처리했을 경우, 엽록소 함량은 오히려 무처리에 비하여 증가하는 경향이였다. GC와 DA를 oxyfluorfen과 혼합처리한 경우 엽록소 함량의 감소가 적었으며, DA+OF 처리보다 GC+OF 처리에서 chlorophyll 함량 감소는 적었다. 그리고 생체중의 경우에서와 마찬가지로 oxyfluorfen 단독처리 및 GC, DA와의 혼합처리에서도 chlorophyll 함량 감소는 **내성**인 벼 Hawon보다는 **감수성**인 벼 Weldpally와 피에서 큰 경향이였다.

GC와 DA 처리에 의한 PPIX 蓄積量(그림 5)은, oxyfluorfen 단독처리의 경우 **내성** 벼 Hawon보다 **감수성** 벼 Weldpally와 피에서 훨씬 많았는데, GC와 DA를 oxyfluorfen과 혼합처리 하였을 때에는 **내성**이나 **감수성** 植物種을 막론하고 oxyfluorfen에 의한 PPIX 蓄積量이 감소되었다. 이와 유사한 결과는 오이 뿌리에 tetrapyrrole 生合成 抑制劑를 처리했을 경우, oxyfluorfen을 비롯한 유사 DPE계 除草劑나 oxadiazon 처리에서도 除草活性이 억제되는 것으로 보고되었던 바 있다^{6,8,23,29}. 따라서 이상의 결과로 볼 때, tetrapyrrole 生合成 抑制劑는 oxyfluorfen에 의한 PPIX 蓄積量을 크게 줄이며, 또한 除草活性도 감소시키므로 PPIX이 DPE계 除草劑의 殺草活性에 있어 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

摘 要

Oxyfluorfen 耐性 및 感受性 벼品種과 감수성 피를 공시하여 oxyfluorfen 처리에 의한 protox 活性沮害, PPIX 蓄積量과 tetrapyrrole 生合性 抑制劑 처리에 의한 oxyfluorfen의 除草活性 억제 효과를 조사하였다.

1. Oxyfluorfen 처리에 따른 protox 活性沮害는 耐性 벼品種들보다 感受性 벼品種들과 피에서 컸다. 특히, $10^{-6}M$ 처리 이상의 농도에서 感受性 벼品種들과 피에서는 완전히 억제되었으나, 耐性 品種들에서는 무처리에 대비하여 32~59%의 活性를 유지하였다.
2. 처리농도가 증가할수록 PPIX의 蓄積量은 증가하였고, 광노출 4시간까지는 증가하나 그 이후에는 감소하는 경향이였다.
3. Oxyfluorfen 처리에 의한 PPIX 蓄積量은 暗條件에서보다 光條件에서 많았다. 光·暗條件에서 感受性 벼品種들과 피는 耐性 벼品種들에 비하여 PPIX 蓄積量이 많았다. 특히, 感受性인 피는 PPIX 蓄積量이 벼品種에 비해 많았다.
4. Tetrapyrrole 生合性 抑制劑인 GC와 DA를 처리하면 oxyfluorfen에 의한 除草活性은 억제되었으며, 耐性 벼品種보다는 感受性 벼品種이나 피에서 그 효과가 떨어지는 경향으로서 엽록소 함량이나 PPIX 蓄積量에서도 동일한 경향을 나타내었다.

引用文獻

1. Bugg, M.W., J. Whitmarsh, C.E. Rieck and S. Cohen. 1980. Inhibition of photosynthetic electron transport by diphenyl ether herbicides. *Plant Physiol.* 65: 47-50.
2. Camadro J.M., M. Matringe, R. Scalla and P. Labbe. 1991. Kinetic studies on protoporphyrinogen. *Biochem. J.* 277: 17-27.
3. Chrystal, E.J.T.T. Cromurtic, R.M. Ellis and M.K. Batters. 1993. Bemzisothiazole aryl

- ethers a novel class of herbicidal protoporphyrinogen oxidase inhibitors. Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 189-194.
4. Coxs, G.S. and D.G. Whitten. 1983. Excites state interactions of protoporphyrin IX and related porphyrins with molecular oxygen in solutions and organized assemblies. In prophyrin photosensitization, D. Kassal, T.J. Dougherty, eds, pp.279-292. Plenum, New York.
 5. Duggan J. and M. Gassman. 1974. Induction of porphyrin synthesis in etiolated bean leaves by chelators of iron. *Plant Physiol.* 53: 206-215.
 6. Duke, S.O., J. Lydon and P.N. Paul. 1989. Oxadiazon activity is similar to that of p-nitro-diphenyl ether herbicides. *Weed Sci.* 37: 152-160.
 7. Duke, S.O., J. Lydon, J.M. Becerril, T.D. Sherman, L.P. Lehnen, JR., and H. Matsumoto. 1991. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 39: 465-473.
 8. Duke, S.O., J.M. Becerril, T.D. Sherman, J. Lydon, and H. Matsumoto. 1990. The role of protoporphyrin IX in the mechanism of action of diphenyl ether herbicides. *Pestic. Sci* 30: 367-378.
 9. Hissin P.J. and R. Hilf. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74: 214-226.
 10. Jacobs J.M. and N.J. Jacobs. 1993. Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare*) plastids. *Plant Physiol.* 101: 1181-1187.
 11. Jacobs J.M., N.J. Jacobs, T.D. Sherman and S.O. Duke. 1991. Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. *Plant Physiol.* 97: 197-203.
 12. Jacobs J.M., N.J. Jacobs, S.E. Brotz and M.L. Guerinot. 1990. Effects of the photobleaching herbicide, acifluorfen-methyl, on protoporphyrinogen oxidation in barely organelles, soybean root mitochondria, soybean root nodules and bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 280(2): 369-375.
 13. Jacobs N.J., S.E. Borotz and M.L. Guerinot. 1989. Protoporphyrinogen oxidaton, a step in heme synthesis in soybean root nodules and free-living rhizobia. *J. of Bacteriology.* 573-576.
 14. Keithly J.H. and K.D. Nadler. 1983. Protoporphyrin formation in rhizobium japonicum. *J. of Bacteriology.* 838-845.
 15. 金鎮石. 1992. 디페닐에테르계 化合物의 殺草類型別 作用機作과 選擇性에 관한 研究. 忠南大 博士學位論文 p.162.
 16. 鞠龍仁·具滋玉·李恩京. 1996. Oxyfluorfen에 대한 耐性 및 感受性 벼品種의 生理活性 機構. I. Callus, 單細胞 및 原形質體 反應. 韓雜草誌. 16(1): 인쇄중.
 17. Lamoureux, G.L., L.E. Stafford and F.S. Tanaka. 1971. Metabolism of 2-chloro-N-isopropylacetanilide (proachlor) in the leaves of corn, sorghum, sugar cane and barley. *J. of Agri. and Food Chem.* 19: 346-350.
 18. Lee, H.J., M.D. Ball and C.A. Bebeiz. 1991. Intraplastidic localization of the enzymes that convert 8-aminolevulinic acid to protoporphyrin IX in etiolated cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 96: 910-915.
 19. Lee, J.J., H. Matsumoto and K. Ishizuka. 1992. Light involvement in oxyfluorfen-induced protoporphyrin IX accumulation in several species of intact plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 44: 119-125.
 20. 李增周. 1992. 光要求型 ジフエニルーテル系 除草劑의 選擇作用 機構에 關する 研究. 日本 博士學位 論文 p.156.
 21. Matringe, M. 1993. Protoporphyrinogen oxidase the molecular target site of peroxidizing her-

- bicides. Brighton Crop Protection Conference -Weeds. 703-712.
22. Matringe, M., J.M. Camadro, P. Labbe and R. Scalla. 1989. Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 260: 231-235.
 23. Matringe, M. and R. Scalla. 1987. Induction of tetrapyrrole accumulation by diphenylether-type herbicides. British Crop Protection Conference-Weeds. 981-996.
 24. Matringe, M. and R. Scalla. 1988. Studies on the mode of action of acifluorfen-methyl in nonchlorophyllous soybean cells. *Plant Physiol.* 86: 619-622.
 25. Matringe, M., D. Clair and R. Scalla. 1990. Effects of peroxidizing herbicides on protoporphyrin IX levels in nonchlorophyllous soybean cell culture, *Pestic. Biochem. Physiol.* 36: 300-307.
 26. Matringe, M., J.M. Camadro, M.A. Block, J. Joyard, R. Scalla, Pierre, and R. Douce. 1992. Localization within chloroplasts of protoporphyrinogen oxidase, the target enzyme for diphenylether-like herbicides. *J. Biological. Chem.* 267(7): 4646-4651.
 27. Matringe, M., J.M. Camadro, P. Labbe and R. Scalla. 1989. Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 260: 231-235.
 28. Matringe, M., R. Mornet and R. Scalla. 1992. Characterization of [³H] acifluorfen to purified pea etioplasts, and evidence that protoporphyrinogen oxidase specifically binds acifluorfen. *J. Biochem.* 209: 861-868.
 29. Matsumoto, H. and K. Ishizuka. 1992. Suppression of oxyfluorfen activity and protoporphyrin IX accumulation in intact cucumber plants by tetrapyrrole synthesis inhibitors. *Weed Research, Japan* 37(2): 153-158.
 30. Matsumoto, H. and S.O. Duke. 1990. Acifluorfen-methyl effects on porphyrin synthesis in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6746. *J. Agric. Food Chem.* 38(11): 2066-2071.
 31. Matsunaka, S. 1969. Acceptor of light energy in photo activation of diphenylether herbicides. *J. Agr. Food Chem.* 17(2): 171-175.
 32. Nandihall, U.B., M.V. Duke and S.O. Duke. 1992. Quantitative structure-activity relationships of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting diphenyl ether herbicides. *Pesticide Biochem. Physiol.* 43: 193-211.
 33. Pardo A.D., B.M. Chereskin, P.A. Castelfranco, V.R. Franceschi and B.E. Wezelman. 1980. ATP requirement for Mg chelatase in developing chloroplasts. *Plant Physiol.* 65: 956-960.
 34. Scalla R., M. Matringe. 1990. Recent advances in the mode of action of diphenyl ethers and related herbicides. *Z. Naturforsch.* 45c: 503-511.
 35. Schuster A. and E. Harel. 1989. A low molecular weight polypeptide which accumulates upon inhibition of porphyrin biosynthesis in maize. *Plant Physiol.* 77: 648-652.
 36. Sherman, T.D., J.M. Becerril, H. Matsumoto, M.V. Duke, J.M. Jacobs, N.J. Jacobs and S.O. Duke. 1991. Physiological basis for differential sensitivities of plant species to protoporphyrinogen oxidase. *Plant Physiol.* 97: 280-207
 37. Sherman, T.D., M.V. Duke, R.D. Clark, E.F. Sanders, H. Matsumoto and S.O. Duke. 1991. Pyrazole phenyl ether herbicides inhibit protoporphyrinogen oxidase. *Pesticide Biochemistry and Physiol.* 40: 236-245.
 38. Shuuichi K., H. Matsumoto and K. Ishizuka. 1991. Protoporphyrin IX accumulation *Lemna paucicostata* Hegelm. caused by diphenyl ether herbicides and their herbicidal activity. *Weed Research, Japan.* 36(4): 318-323.
 39. Witkowski D.A. and B.P. Halling. 1989. Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorfen-methyl. *Plant Physiol.* 90: 1239-1242.