

Oxyfluorfen에 대한 耐性 및 感受性 벼品種의 生理活性 機構

IV. 抗酸化酵素 活性*

鞠龍仁** · 具滋玉**

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

IV. Different Activity of Antioxidative Enzymes*

Kuk, Y.I.** and J.O. Guh**

ABSTRACT

Ten-day-old seedlings of the oxyfluorfen-tolerant and -susceptible rice cultivars with barnyardgrass, a typical susceptible weed were soaked in oxyfluorfen at 10^{-6} M for 2 hrs kept for 24hrs in the dark, and exposed to light for 0, 2, 4, or 6 hrs to investigate changes in the activity and isozyme of antioxidative enzymes.

The activities of antioxidative enzymes of APOX, CAL, POX, NR, GR, MDAR and SOD in the tolerant and susceptible rice cultivars themselves didn't show any difference but the activity in the susceptible barnyardgrass was very low in comparison with rice cultivars. The activity of lipooxygenase tended to be some slightly higher in the susceptible rice cultivars and barnyardgrass than in the tolerant rice cultivars. The activities of MDAR, POX, GR and SOD, antioxidative enzymes, were higher in the tolerant rice cultivars than in the susceptible rice cultivars and barnyardgrass after the treatment of oxyfluorfen.

After the treatment of oxyfluorfen, in the change of POX isozyme, the activity of C band in the tolerant rice cultivars increased with increased concentration but it didn't in the susceptible rice cultivar. The activity of B band decreased slightly at 10^{-4} M in the susceptible barnyardgrass. Isozyme of GR, SOD and AO by the treatment of oxyfluorfen, the activity of each band between the tolerant and susceptible rice cultivars showed no difference but GR isozyme C band was disappeared in the susceptible barnyardgrass at 10^{-4} M. In the change of esterase isozyme resulting from the treatment of oxyfluorfen, the activities of B, C and D bands decreased more in the susceptible rice cultivars than in tolerant rice cultivars, and A band was disappeared in the susceptible barnyardgrass at 10^{-4} M.

Key words : Oxyfluorfen, rice, tolerance, antioxidative enzyme

* 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)

<1996. 2. 5 접수>

緒 言

Oxyfluorfen은 식물체내에서 Protoporphyrin IV (PPIX)을 蓄積시키며, 이것은 광증감에 따라 달리 活性酸素가 발생된다⁴⁰⁾. 산소분자는 好氣性生物에 있어서 반드시 필요하지만, 광합성이나 호흡작용 등과 같은 생명활동 과정에서 細胞內的 생체분자에 강력한 산화력을 갖는 活性酸素種이 되어 해로운 작용을 하기도 한다⁸⁾. 산소장해는 반응성이 높은 산소의 還元分子種(O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$) 및 勵起分子種(1O_2)에 의하여 標的分子가 산화되므로써 일어난다. 반응성이 높은 이 酸素分子種을 活性酸素라 하는데, 細胞成分 특히, 불포화지방의 산화물(LOO \cdot , L, LOOH, LO)도 같은 작용을 하기 때문에 이들을 포함해서 活性酸素라 부른다⁶⁾. 이들 活性酸素種들은 i)광합성 등에 관여하는 여러가지 酵素의 活性 저하^{3,5)}, ii)엽록소와 같은 식물 색소 파괴^{39,46)}, iii)식물체의 가장 중요한 작용을 하는 生體膜의 구성물질인 脂質酸化를 통한 生體膜의 기능파괴 등^{42,45)}의 유해한 작용을 하여 식물체를 손상시키는 것이다. 식물체는 活性酸素에 공격받기 쉬운 생리적, 형태적 조건을 구비하고 있는 반면²²⁾, 이에 대한 대비책으로 活性酸素를 消去시켜 주는 機構도 구비하고 있다. 즉, 活性酸素를 消去시켜 주는 抗酸化酵素 중 superoxide(O_2)는 superoxide dismutase^{36,40)}와 catalase¹²⁾에 의해, hydrogen peroxide(H_2O_2)는 ascorbate peroxidase^{37,40)}에 의해, singlet oxygen(1O_2)은 carotenoid^{22,29,38)} 및 α -tocopherol^{12,13)}에 의해, 그리고 hydroxyl($\cdot OH$)과 같은 free radical들은 triplet chlorophyll이나 α -tocopherol에 의해 無毒化^{22,33)}된다. 또한 식물체에는 活性酸素와 직접 반응하여 이들을 제거하는 抗酸化劑들이 다수 존재한다. 대표적인 것으로는 vitamin C^{13,32,34)}, vitamin E^{13,26,32,35)}, glutathione^{32,38,41)} 등이 있다.

오이에 oxyfluorfen을 처리하면 peroxidase 活性이 증가하는데¹⁹⁾, 이는 acifluorfen을 처리했을 때도 같은 경향²⁰⁾이었다. 淺野⁷⁾는 IEF 및 SDS-PAGE法으로 단백질 및 peroxidase를 분리

하여 paraquat 耐성에 따른 특이 band와 活性度를 확인한 바 있다. Lodonin 등^{27,28)}은 2, 4-D에 대해 感受性인 완두는 peroxidase의 촉매기능이 빨리 변하지만, 耐性인 보리는 peroxidase의 活性에 변화가 없었다고 보고하였으며, Kim 등²¹⁾은 paraquat 처리에 의한 peroxidase 同位酵素의 변화를 polyacrylamide gel 電氣泳動에 의해 大豆에서 조사한 바, 비교적 耐性인 品種에서는 同位酵素 pattern에 거의 변화가 없었으나, 感受性인 品種에서는 다소 변화가 있었음을 인정하였다.

SOD는 superoxide를 H_2O_2 와 분자상 산소로 전환하는데³⁶⁾, 여기에서 발생된 H_2O_2 는 catalase에 의해 불균화되어 H_2O 로 되므로 SOD와 catalase 活性은 앞에서 脂質過酸化程度와 상관이 있는 것으로 보고되었다⁴⁰⁾. Furusawa 등¹⁴⁾은 paraquat에 抵抗性を 나타내는 ryegrass는 paraquat 처리로 SOD 活性이 증가되어 생성된 superoxide(O_2)를 分解시킨다고 보고하였다. Paraquat 抵抗性은 活性酸素種의 無毒化에 관여하는 적어도 3가지의 酵素, 즉 SOD, ascorbate reductase 및 GR에 의해 기인된다고 보고되었으며¹⁵⁾, 또한 GR이 부족시 細胞生長이 억제되는 결과도 *E. coli*의 mutant를 이용한 실험에서 관찰되었다⁴¹⁾. 단백질의 피해는 ascorbic acid peroxidase와 SOD 같은 抗酸化酵素 또는 glutathione, ascorbic acid와 같은 水溶性 抗酸化劑의 量과 관계가 있는데²⁵⁾, Schmidt와 Kunert⁴¹⁾는 耐性 品種의 콩잎에서 glutathione reductase의 活性 및 ascorbate, glutathione의 含量이 증가함을 보고하였다.

따라서 본 연구는 oxyfluorfen에 耐性 및 感受性 벼品種들과 感受性 피간의 生理活性 차이를 항산화 효소들의 활성차이로 알아보았다.

材料 및 方法

1. 抗酸化酵素 活性

前報²³⁾와 동일한 공시재료를 최하시켜 생장상(주간 $30 \pm 2^\circ C$, 야간 $22 \pm 2^\circ C$)에서 10일간 육묘하여 사용하였다.

藥劑處理는 oxyfluorfen(23.5 EC)을 $10^{-6}M$ 로

조제하여 식물체 전체를 2시간 침지처리하고 물로 3회 세척한 후 暗狀態에서 24시간 배양하였다. 그 후 光 $93.1 \mu E. m^{-2}. S^{-1}$ 에 조사하여 0, 2, 4, 6시간 경과시킨 후에 각종 抗酸化酵素 活性를 분석하였다.

抗酸化酵素 活性 測定은 각 식물체 0.25g을 助酵素 추출액(0.1mM Na_2 EDTA를 함유한 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.8) 5ml로 마쇄하여 원심분리(8,000g, 15분, 4°C)한 후 상등액을 助酵素液으로 하였다.

단백질 함량은 micro BCA 방법으로 측정하였고, 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다. 酵素 活性(mg protein)은 무처리에 대한 백분율로 표시하였다.

효소는 nitrate reductase[NR]¹⁷⁾, superoxide dismutase[SOD]¹⁹⁾, peroxidase[POX]⁴⁷⁾, catalase[CAL]³¹⁾, glutathione reductase[GR]⁴³⁾, ascorbate peroxidase [APOX]³⁷⁾, lipoxigenase[LOX]²⁾ 및 MDA reductase [MDAR]¹³⁾를 분석하였다.

2. 抗酸化酵素의 Isozyme

공지식물은 1엽이 전개되는 시기까지 육묘하여 뿌리부위에 부착된 vermiculite를 깨끗이 제거한 후 식물체 전체를 oxyfluorfen(23.5 EC) 0, 10^{-6} 및 $10^{-4}M$ 에 2시간 침지처리한 후 물로 3회 세척하고 暗狀態에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 光 $79.8 \mu E. m^{-2}. S^{-1}$ 에 6시간 노출하여 전기영동 시료로 사용하였다.

光露出 後 0.5g의 지상부를 채취하여 2ml의 酵素抽出 완충액(0.1M Tris-HCl buffer, pH 7.5)을 첨가하여 마쇄 후, 10,000g로 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액에 10% sucrose를 첨가하여 同位酵素 분리를 위한 시료로 사용하였다.

전기영동은 Davis 방법¹⁰⁾을 응용한 연속 및 불연속 gel 방법에 준하여 mini gel(80×100×1.5mm) 규격의 vertical slab 장치에서 gel을 형성시켰다.

각 酵素中 peroxidase와 esterase는 7% polyacrylamide 연속 gel 방법에 준하여, SOD, glutathione reductase 및 ascorbate oxidase는 불연속 gel 방

법에 준하여 실시하였다.

同位酵素 추출시료는 각각 50 μ l로 loading 하였으며 여기에 사용한 전극 완충액은 0.05M tris와 0.38M glycine(pH 8.3)을 1 : 9(v/v)의 비율로 희석시켜 사용하였다. 전류는 1차로 20mA에서 1시간泳動시킨 후 다시 40mA에서 1시간 30분 전기 영동시켰다.

각 酵素別의 發色過程은 다음과 같다.

- Esterase(EST) : Acetone 원액 1ml에 녹인 α -naphthyl acetate 30mg과 fast blue RR salt 50mg을 100ml의 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 7.2)에 녹인 發色液에 gel을 36°C에서 약 20분간 침적하여 發色시켰다²⁴⁾.
- Peroxidase(POX) : Benzidin 용액(benzidin 1g, acetic acid 9ml, 증류수 40ml)과 0.03% H_2O_2 및 증류수를 1 : 1 : 4(v/v)의 비율로 만들어 약 5분간 침적하여 發色시켰다²⁴⁾.
- Superoxide dismutase(SOD) : Riboflavin 0.5mg, TEMED 50 μ l, MTT 5mg을 50ml의 0.1M KH_2PO_4 완충액(pH 7.8)에 暗狀態에서 15분간 방치 후 光에 노출하여 band가 선명할 때까지 發色시켰다¹⁾.
- Glutathione reductase(GR) : 0.01g MTT, 0.208g GSSG, 0.0033g NADPH를 100ml의 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 넣어 band가 보이면 0.01g DCPIP를 넣고 band가 선명해질 때까지 發色시켰다⁴⁾.
- Ascorbate oxidase(AO) : 0.01g Ascorbic acid를 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 넣어 30°C에 15분간 침적하고 완충액을 버린 다음 0.0125g DCPIP/50ml 증류수를 넣어 5~10분간 染色시켰다.
위의 發色된 gel은 탈색시킨 후 사진 촬영 및 zymogram 작성자료로 하였다⁴⁴⁾.

結果 및 考察

1. 體內的 抗酸化酵素 活性

耐성과 感受性 식물들 자체가 보유하고 있는 抗酸化酵素 活性이 藥劑의 生理活性 程度에 影響하는지를 알아본 결과(표 1), APOX, CAL,

Table 1. Comparison in antioxidant contents(μ g/g fresh weight) among selected plant species.

| Species | Enzyme activity/g fresh weight | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|---|--------------------------|-------------------|----------------|---------------|-----------------------|------------------|
| | APOX (Δ A/min) | CAL (Δ A/min) | POX (m mol H ₂ O ₂ /min) | LOX (Δ A/min) | NR (n mol/min) | GR | | MDAR (Δ A) | SOD (u) |
| | | | | | | DTNB | NHDPH | | |
| Tolerant | | | | | | | | | |
| Rice | | | | | | | | | |
| Hawon | 16.0 \pm 1.3 | 5.8 \pm 1.2 | 21.2 \pm 2.8 | 1.8 \pm 0.2 | 144.5 \pm 19.7 | 10.4 \pm 2.0 | 2.4 \pm 0.7 | 4.7 \pm 0.6 | 328.6 \pm 25.4 |
| Hunan 31 | 23.5 \pm 1.5 | 2.1 \pm 0.3 | 23.9 \pm 1.2 | 1.9 \pm 0.3 | 88.0 \pm 11.7 | 7.4 \pm 2.1 | 2.3 \pm 0.6 | 3.4 \pm 0.5 | 344.3 \pm 29.0 |
| Baru | 17.6 \pm 1.4 | 3.8 \pm 0.7 | 21.4 \pm 2.4 | 1.5 \pm 0.5 | 84.5 \pm 6.9 | 8.1 \pm 1.0 | 1.8 \pm 0.2 | 2.9 \pm 0.4 | 297.3 \pm 34.6 |
| Susceptible | | | | | | | | | |
| Rice | | | | | | | | | |
| HP857 | 18.9 \pm 2.1 | 4.0 \pm 0.5 | 19.8 \pm 2.0 | 2.0 \pm 0.1 | 69.5 \pm 4.2 | 8.5 \pm 1.5 | 1.5 \pm 0.7 | 4.3 \pm 0.4 | 319.5 \pm 0.7 |
| HP907 | 18.3 \pm 1.3 | 3.3 \pm 0.7 | 23.9 \pm 1.2 | 2.1 \pm 0.3 | 128.0 \pm 10.3 | 11.1 \pm 2.2 | 3.6 \pm 0.9 | 2.3 \pm 0.4 | 302.0 \pm 10.2 |
| HP1033 | 15.1 \pm 1.0 | 4.2 \pm 1.0 | 16.4 \pm 3.3 | 2.3 \pm 0.4 | 138.0 \pm 15.4 | 8.2 \pm 0.2 | 2.0 \pm 0.4 | 3.5 \pm 0.4 | 273.0 \pm 36.4 |
| Weldpally | 18.2 \pm 1.3 | 2.9 \pm 0.07 | 28.3 \pm 4.1 | 2.0 \pm 0.3 | 53.1 \pm 3.9 | 7.5 \pm 1.0 | 0.9 \pm 0.1 | 2.4 \pm 0.3 | 327.6 \pm 36.8 |
| Barnyardgrass | 0.9 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.01 | 10.5 \pm 2.6 | 3.7 \pm 0.1 | 14.4 \pm 3.0 | 5.1 \pm 1.2 | 0.8 \pm 0.2 | 1.4 \pm 0.1 | 212.5 \pm 20.5 |

POX, NR, GR, MDAR 및 SOD의 항산화酵素活性은 藥劑에 대한 耐性程度와 반드시 일치하지는 않았다. 그러나 벼에서는 전반적으로 APOX, CAL, POX, NR, GR, MDAR 및 SOD의 活性이 피보다 높은 경향을 보였고 특히, APOX, CAL, NR 및 SOD에서는 그 차이가 유의적이었다. 이와 같은 결과는 벼와 피간의 酵素活性을 비교한 金¹⁹⁾의 결과와도 유사하며, 李³¹⁾도 藥劑에 대한 耐性과 抗酸化酵素活性間에 명백한 상관관계를 볼 수 없는 식물도 있지만 耐性이 강한 벼에서는 酵素活性이 높았던 반면 感受性이 큰 메밀에서는 酵素活性이 낮았다는 보고와 맥락을 같이 하며 식물종에 따라 抗酸化酵素活性과 藥劑感受性間에 상관관계가 있을 수 있는 것임을 시사하였다. 그러나 본 연구에서 공시하였던 같은 種内の 耐性 및 感受性 벼品種들간에는 이들 抗酸化酵素들의 양적인 차이가 없었던 점으로 미루어 식물 자체의 抗酸化酵素活性의 차이는 藥劑의 生理活性 정도와 관련이 적을 것으로 생각되었다.

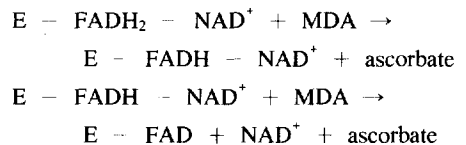
식물체에 존재하는 lipoygenase는 linolenic acid의 過酸化를 유기시키는 酵素로 이의 活性이 높을수록 過酸化가 용이하게 일어날 수 있다고 한다¹⁸⁾. 본 연구에서는 lipoygenase의 活性이 耐性 벼品種들보다 感受性 벼品種들과

피에서 다소 높았다. 특히, 피에서 그 活性이 높았다. 따라서 耐性種들보다는 感受性種들에서 過酸化를 용이하게 할 수 있는 소질을 가지고 있는 것으로 사료된다. 이와 같은 맥락으로 金¹⁹⁾도 피가 벼보다 lipoygenase 活性이 약 4~6배 높은 경향을 보였다고 보고한 바 있다.

2. Oxyfluorfen 處理 後 抗酸化酵素 活性

Oxyfluorfen 처리 후 暗條件에서 24시간 배양하고 光을 0, 2, 4, 6시간 조사한 후에 抗酸化酵素의 活性 변화를 조사하였다.

MDA는 ascorbate의 radical로서 생체성분과 반응하여 해로운 작용을 나타내는데, MDA의 還元酵素(MDAR)는 FADH₂의 환원력을 이용하여 이것을 다음과 같이 원래의 vitamin C로 환원시키는 酵素로 알려져 있다⁹⁾.



이와 같은 기능을 가지고 있는 MDAR의 oxyfluorfen에 대한 영향을 조사한 결과(그림 1), 耐性 벼品種들은 光露出 6시간까지 무처리보다 높은 活性을 유지하였으나, 感受性 벼品種들은 光露出 2시간까지 유지하였고, 感受性 피는 光露出 0시간을 제외한 어느시간에도 무

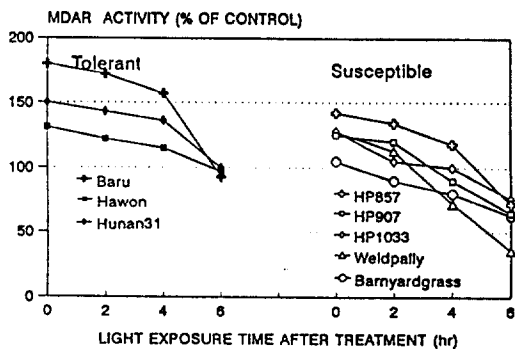


Fig. 1. Effects of oxyfluorfen on MDA reductase (MDAR) activity in selected plant species.

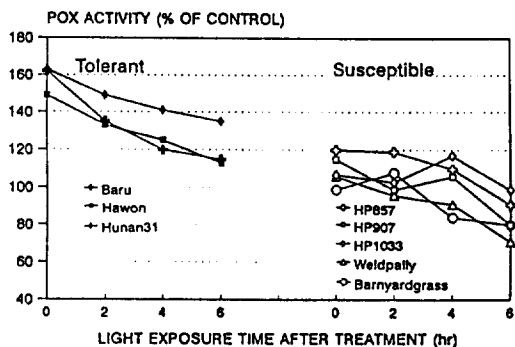


Fig. 2. Effects of oxyfluorfen on peroxidase(POX) activity in selected plant species.

처리와 대등한 活性 수준을 유지하지 못하고 저하하는 경향이였다. 따라서 MDAR 活性의 차이가 oxyfluorfen에 대한 耐性的의 요인으로 관계하는 것으로 추측할 수 있었다.

Oxyfluorfen 처리에 따른 POX의 活性 변화(그림 2)를 보면, 처리 후 POX 活性은 무처리보다 活性이 높으나, 感受性 벼 Weldpally와 피는 光露出 4시간 이후부터 무처리보다 活性이 감소하였다. 그러나 그 活性은 처리 후 光露出 시간이 경과할수록 감소하는 경향을 보였고, 耐性 벼品種들보다 感受性 벼品種들과 피에서 감소가 컸다.

오이에 oxyfluorfen¹⁹⁾이나 acifluorfen²⁰⁾을 처리하므로써 peroxidase의 活性이 증가되었다는 보고가 있다. 그리고 Ladonin 등^{27,28)}은 2, 4-D에 대해 感受性인 완두에 비하여 耐性인 보리는 peroxidase의 活性 변화가 없었다고 보고하였다. 본 연구 결과, oxyfluorfen 처리에 의해 POX 活

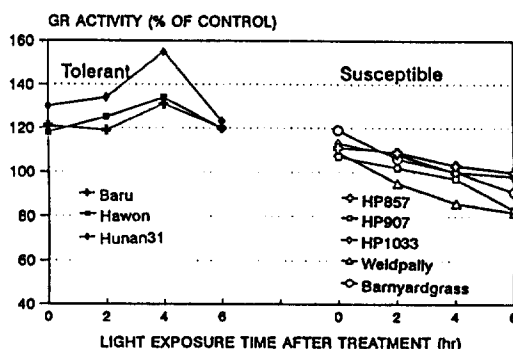


Fig. 3. Effects of oxyfluorfen on glutathione reductase(GR) activity in selected plant species.

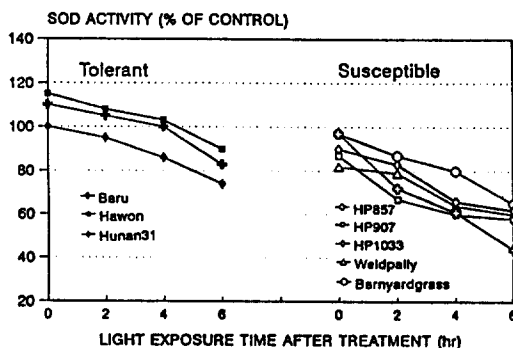


Fig. 4. Effects of oxyfluorfen on superoxide dismutase(SOD) activity in selected plant species.

性은 무처리에 비해 증가하였으나, 그 정도는 感受性 벼品種들이나 피보다 耐性 벼品種들에서 높았다. 따라서 POX 活性의 차이는 oxyfluorfen의 生理活性程度와 관련이 있을 것으로 보였다.

Glutathione reductase³²⁾는 NADPH의 환원력을 이용하여 산화형의 glutathione을 환원형의 glutathione으로 바꾸어 抗酸化作用을 하는데, 이 과정에서 NADPH를 소비하여 細胞內 NADPH/NADP율을 낮추므로써 산화 스트레스를 줄이는 抗酸化作用을 하는 중요한 酵素로 인정받고 있다[GSSH + NADPH + H⁺ → GSH + NADP⁺]. 따라서 이와 같은 특성을 가지고 있는 酵素的 oxyfluorfen 처리에 따른 活性 변화(그림 3)를 보면 耐性 벼品種들은 무처리보다 酵素 活性이 높았고 光露出 4시간까지 그 活性이 증가하다가 4시간 이후에 감소하였다. 그러나 感受性인 벼品種들과 피는 光露出 0시간에만 무처리보다 活性이 높았고, 그 이후에는 活性이 감

소하였다. 즉 GR 活性은 耐性 벼品種들보다 感受性인 벼品種들과 皮에서 活性 감소가 컸다.

Paraquat 耐性은 活性酸素種의 無毒化에 關여하는 적어도 3가지 酵素, 즉 SOD, ascorbate reductase 및 GR에 의해 기인된다고 보고되었으 며¹⁵⁾, 抗酸化酵素인 GR이 부족시 細胞生長이 억제되는 결과도 *E. coli*의 mutant를 이용한 실험으로부터 밝혀졌다⁴¹⁾. 또한 콩에서 acifluorfen 에 의해 일어난 脂質過酸化는 GR 活性이 증가 됨에 따라 감소된다고 하였으며^{16,41)}, Schmidt와 Kunert⁴¹⁾는 耐性 콩잎에서 glutathione reductase, ascorbate 및 glutathione이 증가되었다고 보고하 였다. 본 실험에서도 耐性인 벼品種들이 感受性 벼品種이나 皮보다 GR 活性이 높았던 것으 로 보아, GR이 oxyfluorfen에 대한 耐性を 발휘 하는데 밀접한 역할을 할 것으로 추정되었다.

SOD는 活性 부위에 금속이 붙어있는 metal-loenzyme으로 superoxide 분자를 過酸化水素로 바꾸어 주는 酵素로서^{36,40)} 여러종의 식물체에 다양하게 분포한다. 본 실험의 경우, oxyfluorfen 처리에 의한 SOD 活性 변화는(그림 4), Hunan 31을 제외한 耐性 벼品種들로서 Baru와 Hawon 은 처리 후 光露出 0~4시간까지 무처리에 대 비하여 다소 活性의 증가를 보였으나 感受性 벼品種들과 皮에서는 감소하였는데, 전반적으 로 보아 耐性 벼品種들보다 感受性 벼品種이 나 皮에서 SOD 活性의 감소가 훨씬 큰 경향 이었다.

Furusawa 등¹⁴⁾은 paraquat에 耐性を 나타내는 ryegrass가 paraquat 처리로 SOD 活性이 증가되 므로써 생성된 superoxide를 용이하게 分解시킨 다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 oxyfluorfen에 耐性 벼品種들이 感受性 벼品種이나 皮보다 oxyfluorfen 처리로 인하여 발생된 活性 酸素種을 分解시키는 능력이 뛰어났기 때문으 로 생각되며 이러한 능력의 차이는 oxyfluorfen 에 대한 耐性 要因으로 작용할 것으로 판단되 었다.

3. 抗酸化酵素의 isozyme 變化

공시 벼品種들을 1엽이 전개되는 시기까지

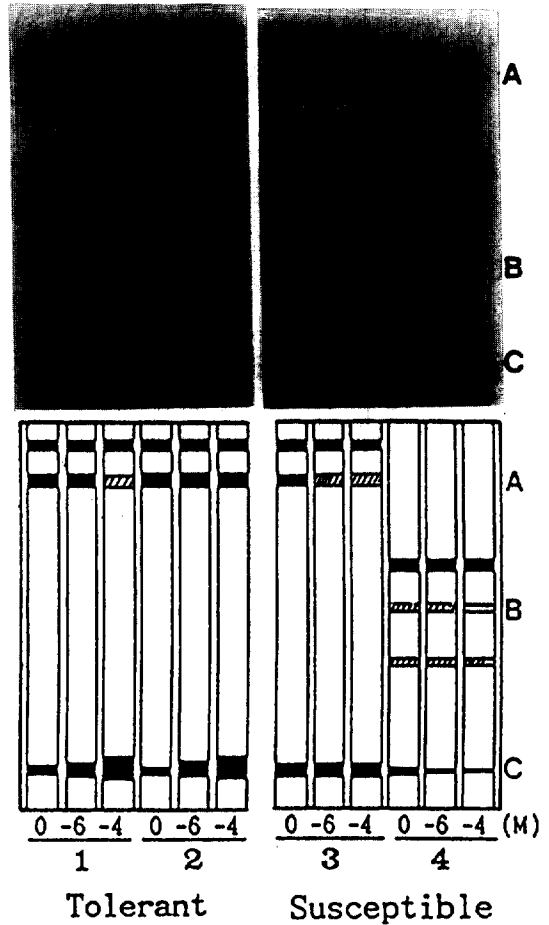


Fig. 5. Zymogram of peroxidase(POX) isozyme variations as affected by treatment of oxyfluorfen (upper) and diagrammatic representation of band patterns in POX (lower) [1: Hawon, 2: Baru, 3: Weldpally, 4: Barnyardgrass].

육묘하여 oxyfluorfen을 10^{-6} 및 10^{-4} M로 식물체 전체를 2시간 침지처리하고 光에 6시간 노출 시켜 전기영동 시료로 사용하였다.

Oxyfluorfen 처리에 따른 POX isozyme 전개 를 전기영동시킨 결과(그림 5) 공시식물에서 6 ~9개 band가 분리되었으나 耐性和 感受性間의 차이는 크게 3개 band에서 볼 수 있었다. 耐性인 벼品種 Hawon에서는 oxyfluorfen 10^{-4} M 처리시 무처리에 비해 A band 活性이 다소 감소하였으나, Baru에서는 活性 감소를 볼 수 없 었다. 그러나 感受性인 벼 Weldpally는 10^{-6} M 처리에서도 A band 活性이 어느 정도 감소하

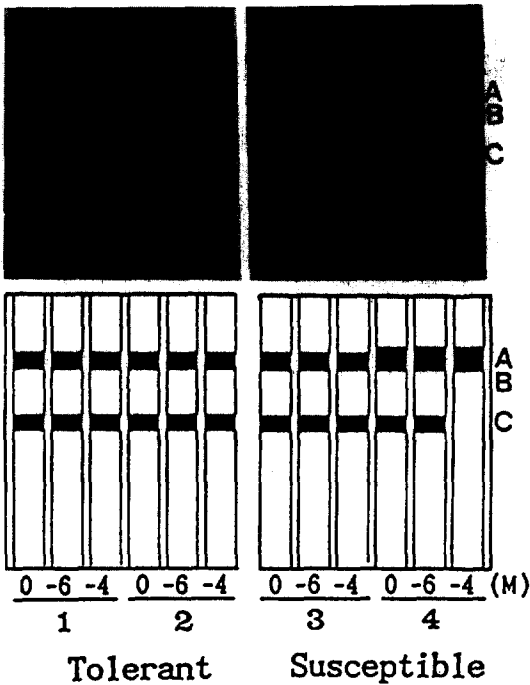


Fig. 6. Zymogram of glutathione reductase (GR) isozyme variations as affected by treatment of oxyfluorfen (upper) and diagrammatic representation of band patterns in GR (lower).

었다. 또한 耐性인 벼品種들에서는 C band가 oxyfluorfen 처리로 인하여 活性이 현저히 유도 되었으나, 感受性인 Weldpally에서는 C band 活性 증가를 볼 수 없었다. 또한 感受性인 피에서는 B band도 $10^{-4}M$ 처리에서 活性이 다소 감소하였다. Kim 등²¹⁾은 paraquat 처리에 의한 大豆에서의 peroxidase 同位酵素 변화를 전기영동에 의하여 조사한 바, 비교적 耐性인 品種에서는 同位酵素 pattern이 거의 변화가 없었으나 感受性인 品種에서는 다소 活性이 감소되었던 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서와 같이 耐性 벼品種에서 活性 변화가 없거나 오히려 특정 band의 活性이 증가했던 결과와 유사한 경향으로 보였다. Oxyfluorfen에 대한 生理 活性 차이는 POX 전체 活性의 차이보다 POX isozyme에 의한 특정 band의 차이에 관련성이 클 것으로 생각된다.

抗酸化酵素 GR의 isozyme 변화(그림 6)를 보면 oxyfluorfen 처리를 하더라도 耐性과 感受性

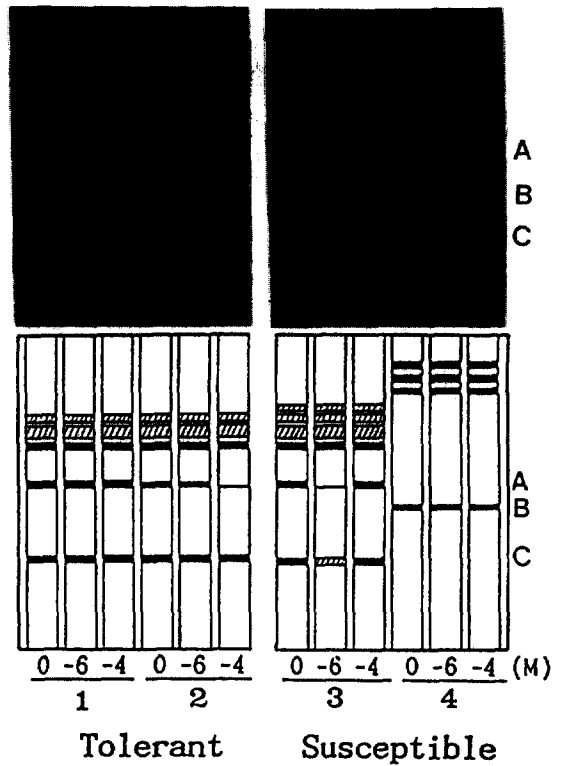


Fig. 7. Zymogram of superoxide dismutase (SOD) isozyme variations as affected by treatment of oxyfluorfen (upper) and diagrammatic representation of band patterns in SOD (lower).

植物種間에 각 band의 活性에는 차이가 없었다. 즉, oxyfluorfen 처리 농도가 10^{-6} 과 $10^{-4}M$ 를 처리하더라도 耐性과 感受性 벼品種間에는 酵素 活性의 변화가 없었으나, 感受性인 피에서는 $10^{-4}M$ 처리에서 C band가 소실되었다.

SOD의 각 band 活性의 변화를 보면(그림 7) 대략 5~6개 band가 분리되었으나, 活性 유도 및 감소 band는 3개로 볼 수 있었다. 耐性인 벼 Hawon에서는 각 band의 活性감소가 없었으나, 感受性인 벼 Weldpally는 $10^{-6}M$ 처리에서 A band가 소실되었고, C band 活性이 감소하였다. 感受性인 피에서는 band 活性에 큰 변화가 없었다. 따라서 SOD isozyme에 의한 특정 band 차이보다는 앞의 결과처럼 SOD 전체 活性에 의한 차이가 生理 活性과 관련이 있을 것으로 생각된다.

Ascorbate oxidase^{37,40)}는 SOD와 더불어 活性

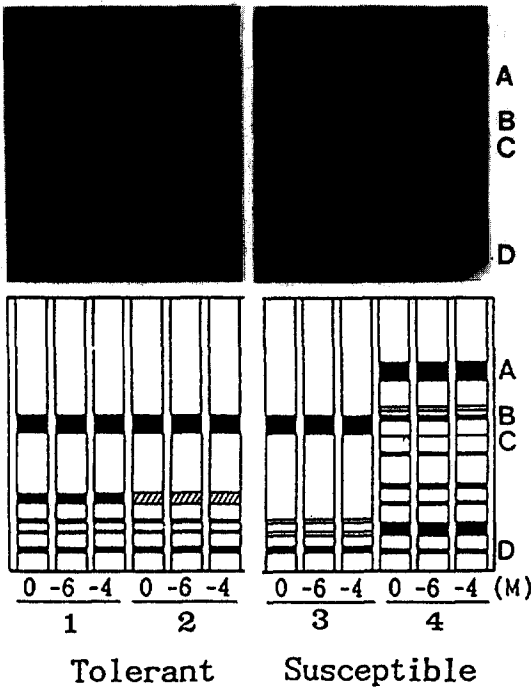


Fig. 8. Zymogram of ascorbate oxidase(AO) isozyme variations as affected by treatment of oxyfluorfen(upper) and diagrammatic representation of band patterns in AO(lower).

酸素를 消去하는 기능을 갖는 酵素로서, 환원형의 ascorbate가 過酸化水素를 환원하여 H₂O로 불균화 시키는 작용을 한다.

Oxyfluorfen 처리에 따른 AO isozyme 변화(그림 8)에서는 5~10개 band를 볼 수 있는데 oxyfluorfen 처리에 의한 각 band 活性에는 특징적인 변화가 없었다. 그리고 耐성과 感受性 植物種間에도 차이가 없었던 점으로 미루어 AO isozyme은 生理活性 차이에 별로 관여하지는 않는 것으로 생각되었다.

Oxyfluorfen 처리에 따른 esterase의 band pattern은 그림 9와 같이 대략 3~5개의 band를 확인할 수 있었다. Oxyfluorfen에 耐性인 벼 Hawon은 B, C, D band 活性이 10⁻⁴M 처리에서 감소하였고, 벼 Baru에서는 10⁻⁶과 10⁻⁴M 처리시 B, D band 活性이 다소 감소하였던 반면, 感受性인 벼 Weldpally에서는 10⁻⁶과 10⁻⁴M 처리시 B, C, D band의 活性 감소가 耐性 벼品種들에서 보다 컸다. 感受性인 피에서는 A

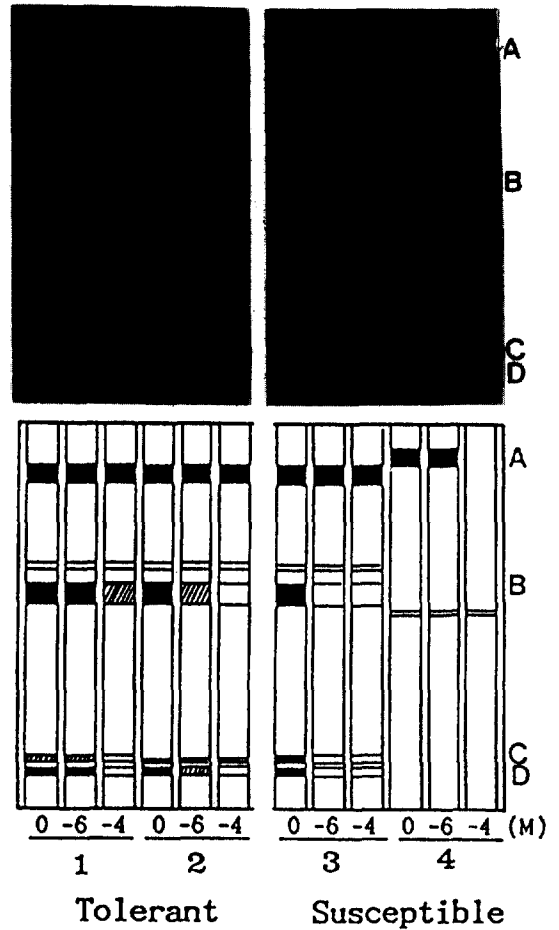


Fig. 9. Zymogram of esterase(EST) isozyme variations as affected by treatment of oxyfluorfen(upper) and diagrammatic representation of band patterns in EST(lower).

band가 10⁻⁴M 처리에서 소실되기도 하였다. Esterase는 식물체 지방산의 加水分解 酵素¹¹⁾로서 이 과정을 통한 membrane의 변화는 耐성을 증대시키는 역할을 하므로, 식물에 따라서는 경화(hardening)되는 특성과 더불어서만 발견되기도 한다. 본 실험에서 각 band의 活性이 耐性 벼品種이 感受性 벼品種이나 피보다 높았던 것은 이와 유사한 해석을 가능케 하였다.

摘 要

Oxyfluorfen에 耐性 벼 3品種과 感受性 벼 4品種 및 피를 공시하여 10⁻⁶M 농도로 처리하여

24시간 暗培養하고 光에 0, 2, 4, 6시간 노출 후에 抗酸化酵素의 활성 차이와 抗酸化酵素의 isozyme 변화를 조사하였다.

1. 耐性 및 感受性 벼品種 자체의 APOX, CAL, POX, NR, GR, MDAR 및 SOD의 抗酸化酵素 活性은 차이가 없었으나, 感受性인 피는 다른 벼品種들보다 活性이 아주 낮았다. 그리고 lipoygenase는 耐性 벼品種들보다 感受性 벼品種과 피에서 活性이 다소 높은 경향이었다.
2. Oxyfluorfen 처리 후 抗酸化酵素인 MDAR, POX, GR 및 SOD는 耐性 벼品種들이 感受性 벼品種들과 피보다 活性이 높았다.
3. Oxyfluorfen 처리 후 POX 同位酵素 변화는 처리농도가 증가할수록 耐性 벼品種들에서 C band 活性이 증가하였으나, 感受性 벼品種에서는 活性 증가가 없었다. 感受性 피에서는 B band가 $10^{-4}M$ 처리에서 活性이 다소 감소하였다.
4. Oxyfluorfen 처리에 따른 GR, SOD 및 AO 同位酵素는 耐性과 感受性 벼品種들간에 각 band 活性은 차이가 없었으나, GR 同位酵素는 $10^{-4}M$ 처리시 感受性인 피에서 C band 가 소실되었다.
5. Oxyfluorfen 처리에 따른 esterase 同位酵素의 변화는 B, C 및 D band에서 耐性 벼品種보다 感受性 벼品種에서 活性 감소가 컸으며, 感受性인 피는 $10^{-4}M$ 처리시 A band가 소실되었다.

引用 文 獻

1. Beauchamp, C., and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assays applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
2. Ben-Aziz, A., G. Grossman, I. Ascarelli and P. Budowski. 1970. Linoleate oxidation induced by lipoygenase and heme proteins. *Anal. Biochem.* 34: 88-100
3. Brennan, T. and L.E. Anderson. 1980. Inhibi-

tion by catalase of dark-mediated glucose-6-phosphate dehydrogenase activation in pea chloroplasts, *Plant Physiol.*, 66: 815.

4. Brewer, G.J. 1970. An Introduction to isozyme techniques. Academic press. New York. London. p.186.
5. Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 79.
6. 淺田 浩二. 1988. 活性酸素の生成・消去・作用・蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊「活性酸素」33: 2659-2664.
7. 淺野 紘臣. 1988. ハルジオンのパラコート抵抗性. 主としてパラコート 処理後 タンパクおよびパーオキシターゼの變化一. (日) 雜草研究 33-別: 207-208.
8. 淺田 浩二. 1985. 植物の光酸素障害—その抑制と増幅. *日本農藥學會志* 10: 729-743.
9. 淺田 浩二. 1988. アスコルン酸ペルオキシターゼ. 蛋白質 核酸酵素 臨時増刊「活性酵素」33: 2957-2964.
10. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis-II. method and application to humans serum proteins. *N.Y. Acad. Annals* 121: 404-427.
11. Devlin R.H. and F.H. Witham. 1983. *Plant physiology*, Will and Grant Press, Boston.
12. Dodge. A.O. 1983. Toxic oxygen species and herbicide action, *Pest. Chem.* 59-66.
13. Finckh, B.F and K.J. Kunert. 1985. Vitamin C and E : An antioxidative system against herbicide-induced lipid peroxidation in higher plants. *J. Agric. Food Chem.* 33: 574-577.
14. Furusawa, I., K. Tanka, P. Thanutong, A. Mizuguchi, M. Yazaki and K. Asada. 1984. Paraquat resistant tobacco callus with enhanced superoxide dismutase activity. *Plant and Cell Physiol.* 25: 1247-1254.
15. Gressel. J. 1987. Appearance of single and multi-group herbicide resistances and strategies for their prevention. *British Crop Protection Conference-Weeds.* 5(3): 479-488.
16. Grill, O.H., U.K. Esterbauer 1979. Effect of

- sulphur dioxide on glutathione in leaves of plants. Environ. Pollut 19: 187-194.
17. Hageman R.H. and A.J. Reed. 1980. Nitrate reductase from higher plants. Methods in enzymology I. 69: 270-280.
 18. Hildebrand, D.F. 1989. Lipoxygenases. Physiol. Plant. 76: 249-253.
 19. 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.
 20. 金泰完, 姜炳華. 1988. Acifluorfen의 莖葉處理가 대두 및 바랭이의 葉組織에서 peroxidase 活性에 미치는 影響. 韓國環境農學會誌 7: 52-57.
 21. Kim, K.U., D.U. Kim and S.T. Kwon. 1986. Development of herbicide(paraquat) tolerant plant through tissue culture. I. Mechanism of plant tolerance to paraquat. Kor. J. Weed Sci. 6(2): 191-200.
 22. Knox J.P. and A.D. Dodge. 1985. Review article number 7 singlet oxygen and plants. Phytochemistry. 24(5): 889-896.
 23. 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): 42-53.
 24. 鞠龍仁·具滋玉·李度鎮·金永住. 1988. Oxyfluorfen에 대한 耐性 및 感受性인 水稻品種의 電氣泳動 表現型差異. 韓雜草誌 8(2): 199-207.
 25. Kunert K.J., C. Homrghagsen, H.B. and P. Böger. 1985. Oxyfloufen and lipid peroxidation : Protein damage as a phytotoxic consequence. Weed Sci. 33: 766-770.
 26. Kunert, K.J. and P. Boger. 1984. The diphenyl ether herbicide oxyfluorfen : Action of anti-oxidants. J. Agric. Food chem. 32: 725-728.
 27. Ladonin, V.F. and N.B. Pronina. 1977. The influence of 2, 4-D on oxidase and peroxidase activity in barley and pea leaves. Fiziologiya : Biokhimiya Kupturnykh Rastenii 9(3): 249-253.
 28. Ladonin, V.F. and N.V. Pronina. 1977. Some peculiarities of peroxidase from the chloroplasts of barley and peas treated with 2, 4-D. Doklady Vsesoyuznoi Akademii sel, Skokhzyalstvennykh Nauck Imeni V.I. Benina No. 8: 13-14.
 29. Lambert, R. and P. Böger. 1984. Peroxidative activity of oxyfluorfen with regard to carotenoides in scenedesumus. J. Agric. Food Chem. 32: 523-526.
 30. 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.
 31. 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 筑波大 博士學位 論文 p156.
 32. 二木 銳雄. 1988. 活性酵素의 消去: 低分子 化合物: 아스콜빈과 글루타치온. 蛋白質 核酸 酵素 臨時增刊「活性酵素」 33: 2973-2978.
 33. 二木 銳雄. 1990 生體內における 酵素毒性에 對する 防禦活性酵素種化學. 季刊 化學總說 7: 177-190.
 34. 日本ビタミン學會 編. 1989. 비타민C·비타민 핸드북 「비타민分析法」 p.135-144.
 35. 日本ビタミン學會 編. 1989. 비타민E·비타민 핸드북 「비타민分析法」 p.27-35.
 36. Mccord, J.M. and I. Fridorich. 1969. Superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 244: 6049-6055.
 37. Nakano, Y. and K. Asada. 1981 : Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant & Cell Physiol. 22: 867-880.
 38. Peter B. 1987. Possible targets for phytotoxic compounds. J. Pesticide Sic. 12: 749-757.

39. Rensen, V, J.J.S. 1975: Lipid peroxidation and chlorophyll destruction caused by diquat during photosynthesis in *Scenedesmus*. *Physiol. Plant.*, 33: 42.
40. Sarson, R.A. 1988. Review article number 30. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27(4): 969-978.
41. Schmidt, A. and K.J. Kunert. 1986. Lipid peroxidation in higher plants. The role of glutathione reductase. *Plant Physiol.* 82: 700-702.
42. Schobert, B., Elstner, E.F. 1980. Production of hexanal and ethane by phaeodactylum *tricornutum* and its correlation to fatty acid oxidation and bleaching of photosynthetic pigments. *Plant Physiol.* 66: 215.
43. Smith, I.K., T.L. Vierheller and C.A. Thorne. 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175: 408-413.
44. Tanksley, S.D and T.J. Orton. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam-Oxford New York. p.516.
45. Whitehouse, D.G., Ludwig, L.J. and Walker, D.A. 1971 : Participation of the meher reaction and catalase in the oxygen exchange of chloroplast preparations, *J. Exp. Bot.* 22: 772.
46. Wise, R.R. and Naylor, A.W. 1987. Chilling enhanced photooxidation. evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogeneous antioxidants. *Plant Physiol.*, 83: 278.
47. Yamasue, Y., K. Ueki and H. Chisaka. 1987. Seed dormancy and germination of *Echinochloa oryzicola* Vasing: An observation through respiration and several enzyme activities. *Weed Research Japan.* 32(3): 188-197.