

## 울무(*Coix lacryma-jobi*)의 제초제 Simazine에 대한 내성기구

마상용 · 김종석 · 전재철<sup>1)</sup>

우석대학교 생명자원과학부, <sup>1)</sup>전북대학교 농화학과

### Tolerance Mechanism to Simazine in *Coix lacryma-jobi*

Sang-Yong Ma, Jong-Seok Kim and Jae-Chul Chun<sup>1)</sup>(Division of Life Resource Science, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea ; <sup>1)</sup>Dept. of Agricultural Chemistry, Jeonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

**Abstract :** Tolerance mechanism to simazine (6-chloro-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) in *Coix lacryma-jobi* was investigated with respect to herbicide detoxification via glutathione conjugation. Simazine was initially absorbed by seedlings of *C. lacryma-jobi* and corn, but after 12 hours of treatment, no significant difference in simazine absorption was found in both species. Simazine absorbed was rapidly metabolized to glutathione-simazine conjugate. One to six hours after treatment, metabolism was approximately 2-fold faster in *C. lacryma-jobi* than in corn. Glutathione content was found 1.5- and 2.3-fold higher in coleoptile and root of *C. lacryma-jobi*, respectively, compared with corn. In both species, the highest concentration of glutathione was found in coleoptile tissue. Glutathione S-transferase that exhibits activity with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene was not significantly different between two species. However, glutathione S-transferase activity with simazine was approximately 2-fold greater in *C. lacryma-jobi* than in corn. The glutathione S-transferase activity was 20 to 30% greater in shoot of either species than in root. Fast protein liquid chromatography-anion exchange column was used to separate glutathione S-transferase isozymes in coleoptiles of *C. lacryma-jobi* and corn. A peak of glutathione S-transferase activity with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and two peaks of glutathione S-transferase activity with simazine from *C. lacryma-jobi* were coeluted with those from corn, but showed greater activity than in the case of corn. Another glutathione S-transferase isozyme that exhibits activity with simazine was detected in the elution of *C. lacryma-jobi* extract, but not in corn. Electron transport in chloroplast thylakoids isolated from leaves of both species was equally sensitive to simazine applied at 1 to 100 nM. These results indicate that the simazine tolerance in *C. lacryma-jobi* is due to its capacity to detoxify the herbicide via glutathione conjugation, which is positively correlated with the level of glutathione content and glutathione S-transferase activity.

## 서 론

Triazine계 제초제인 simazine은 잡초 출아전에 사용하는 토양처리형 제초제로서 우리나라에서는 일년생 광엽잡초를 대상으로 과수원 및 옥수수등 화분과 작물 재배시에 이용되고 있다. 일반적으로 triazine계 제초제는 감수성 초종에서 엽록체 thylakoid막에 존재하는 photosystem II 전자전달 매개체중 하나인 D1 단백질에 결합하여 정상적인 전자전달을 방해함으로써 그 제초활성을 나타낸다<sup>1)</sup>. 반면에 저항성 초종에서는 hydroxylation 또는 GST에 의하여 촉매되는 GSH와의 conjugation을 통하여 신속히 불활성화 된다<sup>2)</sup>. 특히 GSH 함량과 GST 활성은 초종별로 다르게 나타나기 때문에 이에 따라 제초제에 대한 반응성이 크게 달라질 수 있다<sup>3)</sup>. Velvetleaf 저항성 종의 경우에는 GSH 함량에 있어서 감수성 초종과 거의 차이를 보이지 않았으나, atrazine에 대하여 특이성을 갖는

GST isozyme의 활성증대를 나타내었다<sup>4)</sup>. 옥수수에서는 제초제의 종류에 따라 다양한 활성 변화를 나타내는 GST isozyme들이 존재하며, 이들의 활성 변화와 기질특이성에 따라 triazine계 제초제의 대사에 차이가 나타난다고 보고되었다<sup>5,6)</sup>.

앞서 저자 등<sup>7)</sup>은 약용식물에 대하여 사용 가능한 선택성 제초제를 선발할 목적으로 수행한 일련의 실험을 통하여 울무에 있어서 제초제 simazine에 대한 저항성을 보고한 바 있다. 포장 및 포트조건에서 울무는 simazine의 일반 시용량의 4~6배량 처리에서도 정상 생육을 보였으며, 이는 화분과 작물인 옥수수의 경우보다 더 높은 수준의 저항성인 것으로 나타났다. 일반적으로 제초제에 대한 저항성은 흡수 및 이행성의 저하, 불활성화의 증대 및 작용점의 변형을 통하여 나타난다<sup>8)</sup>. Simazine은 작물 및 잡초의 출아 전에 처리되는 토양처리형 제초제로서 식물체가 왕성한 광합성을 하기 이전에 처리되므로 충

분한 제초활성을 발현하기 위해서는 약제가 식물체 내로 흡수된 후, 식물체내에서 활성형의 simazine으로 일정 기간 동안 축적되어 있어야만 한다. 따라서 이 경우에는 작용점 수준에서의 저항성 발현에 앞서 약제의 흡수속도와 흡수된 약제의 신속한 불활성화 여부가 저항성 발현의 주요 기작으로 작용할 것이 예상된다. 또한 triazine계 제초제의 대사는 효소적 또는 비효소적인 반응을 통하여 나타날 수 있으며, 효소적 반응의 경우에는 주로 GST가 촉매하는 GSH와의 conjugation을 통하여 나타나는 것으로 보고되고 있다<sup>2,3)</sup>. 만일 울무의 simazine 내성이 GSH conjugation에 의한 제초제 불활성화에서 기인한다면, 이러한 불활성화 반응에 관여하는 효소 및 반응기질의 분포가 감수성 초종과는 다른 양상으로 나타날 것이 예상된다.

따라서 본연구에서는 이러한 가설을 토대로 울무에서 나타나는 simazine에 대한 내성 발현을 설명하기 위하여 생육초기의 울무를 대상으로 simazine의 흡수 양상 및 GSH와의 conjugation에 의한 대사 여부를 검정하고, 이러한 불활성화 반응에 관여하는 주요인자인 GSH 함량과 GST 활성의 차이를 저항성 작물인 옥수수와 비교하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### Simazine의 흡수 및 대사

생육 초기의 울무와 옥수수에 있어서 simazine의 흡수 및 GSH-simazine conjugation 대사활성의 차이를 비교하기 위하여 암소에서 4일간 생육시킨 울무와 옥수수의 유식물체를 1 mM KCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 μM [<sup>14</sup>C]simazine (specific activity : 5.4 μCi/μmol)이 포함되어 있는 배양액내에서 1, 6, 12, 24, 36, 48시간 동안 배양하였다. 배양기간 동안 aerator를 이용하여 배양액에 공기를 주입하였으며, 배양기는 온도 30°C, 상대습도 70%로 유지되었다. 배양 후 채취한 시료를 증류수로 신속히 세척하고 지상부와 근부로 분리하여 80% acetone을 이용하여 마쇄 추출하였다. 추출액을 30°C에서 감압 농축하고 3 ml로 정용한 다음, 6 ml의 methylene chloride로 2 회에 걸쳐 분획하였다. 분획한 물층과 methylene chloride층에 존재하는 방사능을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였으며, GSH-simazine conjugate의 표준품을 실험실상에서 합성하여 thin-layer chromatography 상에서 대사물질을 확인하였다. Gronwald 등<sup>9)</sup>이 이용한 3종류의 TLC 전개용매를 사용하여 분획한 물층에 대부분의 대사물질이 존재하며, 대사물질의 정체가 GSH-simazine conjugate임을 비교 확인하였다.

### GSH 함량

울무와 옥수수의 유식물체에 대한 GSH 추출액의 준비

및 함량 측정은 전 등<sup>10)</sup>이 행한 방법에 의하여 실시하였다. 액체질소로 냉각시킨 유발에 5% trichloroacetic acid (w/v)와 10 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)를 포함하는 250 mM potassium phosphate (pH 6.5) 완충액을 담고 채취한 식물조직을 신속히 마쇄하였다. 마쇄한 시료를 2,000g에서 2.5분간 원심분리하고 상등액을 취하여 10,000g에서 15분간 다시 원심분리하였다. 상등액을 취하여 함량측정을 위한 추출액으로 하였으며, 모든 시료는 추출후 6 시간 이내에 사용하였다. GSH 함량 검정을 위한 반응액은 10 mM EDTA, 1mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), 소정의 GSH 및 추출액이 포함되어 있는 100 mM potassium phosphate (pH 6.8)용액을 사용하였으며, 여기에 equine GST (0 또는 1 unit)를 가함으로써 반응을 개시하였다. 반응액의 총량은 1 ml로 하였으며, 반응개시 25분 후에 340 nm에서 흡광도를 측정하고 반응계수를 산출하였다. 하나의 시료에 대한 반응계수는 반응액중의 GSH 농도를 여러 단계 (0~100 nmol)로 첨가하여 1차 회귀식에 의하여 보정하였다. 추출액중의 GSH 함량은 GST가 포함되어 있는 용액의 반응계수와 GST가 포함되어 있지 않은 용액의 반응계수의 차이에 의하여 결정하였다.

### GST 활성

GST 조효소액의 추출 및 활성검정은 Anderson 등<sup>4)</sup>의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 울무와 옥수수의 유식물체를 액체질소로 냉각시킨 유발을 이용하여 2 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 및 5% polyvinyl pyrrolidone (w/v)이 포함된 100 mM potassium phosphate (pH 6.8) 용액 내에서 신속히 마쇄하였다. 마쇄한 시료를 cheesecloth와 miracloth를 이용하여 여과한 다음, 20,000g에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 GST 활성 검정을 위한 조효소액으로 하였으며, 추출 후 6시간 이내에 사용하였다. GST의 활성검정은 GST의 일반적인 기질로 사용되는 CDNB와 불활성화 대상 제초제인 simazine을 기질로 실시하였다. 먼저 CDNB를 기질로 하는 GST 활성 (GST[CDNB])의 검정은 1 mM CDNB과 10 mM GSH가 포함되어 있는 100 mM potassium phosphate (pH 6.8) 용액에서 실시하였으며, 반응액의 총량은 1 ml로 하였다. 반응은 반응액에 조효소액을 가한 직후에 개시되었으며, 340 nm에서 초기 흡광도의 변화와 몰 흡광계수 (9.6 nmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)에 의하여 반응속도를 산출하였다. Simazine을 기질로 하는 GST의 활성 (GST[simazine])은 10 mM GSH, 20 μM [<sup>14</sup>C]simazine 및 조효소액이 포함된 100 mM potassium phosphate (pH 6.8) 용액에서 검정되었으며, 반응액의 총량은 500 μl로 하였다. 반응액에 [<sup>14</sup>C]simazine을 가한 직후 부터 반응에 개시되었으며, 1시간 동안 실온에서 진행시켰다. 반응액에 1 ml의 methylene chloride을 가함으로써 반응이 종료

되었으며, 물층과 methylene chloride층을 분획하여 각 층에 존재하는 방사능을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였다. GST의 활성은 조효소액을 포함한 반응액에서의 반응속도와 조효소액을 포함하지 않는 반응액에서의 반응속도의 차이에 의하여 결정하였다. 추출액 중의 총 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준으로하여 Bradford<sup>11)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다.

**GST isozyme 활성**

GST isozyme의 활성검정은 Dean 등<sup>9)</sup>이 행한 방법에 따라 실시하였다. 상기의 조효소액을 100,000g에서 60분간 원심분리하고 상등액을 PD-10 컬럼 (Sephadex-G25)에 100 mM potassium phosphate (pH 6.8) 용액을 이용하여 통과 시켰다. 여액을 다시 microfilter (45 μm)로 여과하고 FPLC-anion exchange (Mono Q)컬럼에 충전 시켰다. NaCl의 농도에 따라 용출되는 단백질을 0.5 ml min<sup>-1</sup>의 속도로 수집하였다. GST 활성을 나타내는 단백질은 NaCl의 0.5~2.5 M 범위에서 거의 모두 용출되었다. 각 용출액에 대한 GST 활성은 상기와 같은 방법으로 검정하였다.

**Thylakoid 추출 및 전자전달 활성**

울무 및 옥수수 of the 경엽부로 부터 엽록체 thylakoid막을 추출하기 위하여 Norman 등<sup>12)</sup>이 행한 방법을 변형하여 사용하였다. 먼저 일정기간 생육시킨 각 식물체의 완전 엽을 채취하고 -30°C에서 냉각시킨 유발을 이용하여 5 mM ascorbate, 3 mM MgCl<sub>2</sub> 및 400 mM sorbitol이 포함되어 있는 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.8) 용액하에서 균질화하였다. 추출액을 4겹의 cheese cloth로 여과하고 1,500g에서 5분간 원심분리하였다. 분리관에 남은 잔류물을 최초 시료량을 기준으로 1:2 (w/v)의 비율로 10 mM NaCl과 5 mM MgCl<sub>2</sub>가 포함된 10 mM Tricine-NaOH (pH 7.8)에 분산시킨 다음, 10,000g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 잔류물을 다시 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 및 100 mM sorbitol이 포함된 10 mM Tricine-NaOH (pH 7.8) 용액에 최초 시료량을 기준으로 2:1 (w/v)의 비율로 재분산하여 thylakoid막 추출액으로 사용하였다. 추출 직후에 Arnon<sup>13)</sup>의 방법에 의하여 추출액 중의 chlorophyll 함량을 측정하였다. Simazine 처리에 따르는 thylakoid막의 photosystem II 전자전달 활성의 변화를 검정하기 위하여 Darr 등<sup>14)</sup>이 행한 바와 같이 thylakoid막 추출액의 첨가에 의하여 나타나는 2,6-dichlorophenol indopenol(DCPIP)의 환원을 580 nm에서 측정하는 방법을 사용하였다. 반응액은 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NH<sub>4</sub>Cl, 100 mM sorbitol, 1 μM Gramicidin D, 50 μM DCPIP, thylakoid막 추출액 및 소정의 simazine (0~100 μM)이 포함된 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH (pH 6.8) 용액을 사용하였다. 반응액의 총

양은 3 ml로 하였으며, 추출액의 농도는 20~25 μg chl. ml<sup>-1</sup> 수준이었다. 이 반응액에 적색광 필터 (Corning 2-58)로 단색화시킨 actinic광을 조사하였으며, 반응개시 직후 부터 30초 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. 또한 simazine 또는 thylakoid막 추출액을 배제한 별도의 반응액으로 부터 흡광도를 측정하여 DCPIP의 환원치를 보정하였다.

**결과 및 고찰**

**Simazine 흡수 및 대사**

울무의 simazine에 대한 내성이 약제의 특이적인 흡수 저하로 인하여 나타나는지 여부를 조사하기 위하여 [<sup>14</sup>C]simazine이 포함된 배양액에서 일정기간 배양한 울무와 옥수수의 유식물체를 대상으로 그 흡수 양상을 비교하였다(그림 1). 울무와 옥수수 모두 약제 처리 초기에 simazine의 흡수가 신속히 이루어졌으며, 약제처리 6~12 시간 후까지는 옥수수에 비하여 울무에서 더 빠른 속도로 흡수되는 경향을 보였다. 그러나 처리 12시간 후 부터는 두 초종 간의 흡수속도에 있어서 차이가 인정되지 않았다. 이 결과는 울무의 simazine에 대한 내성이 단순히 약제 흡수의 저하에 의한 것이 아니며, 울무에 존재하는 다른 내성기작이 두 초종 사이에 나타나는 simazine에 대한 감수성의 차이를 유발하는데 기여하고 있음을 시사해 주고 있다.

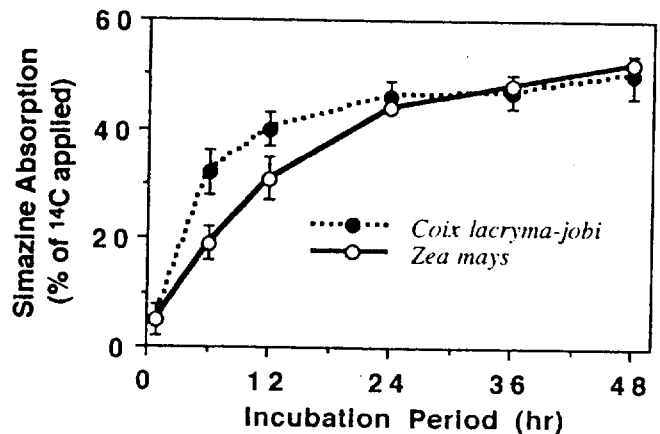


Fig. 1. Absorption of [<sup>14</sup>C]simazine by 4-day-old seedlings of *Coix lacryma-jobi* and *Zea mays*. See materials and methods.

울무에 흡수된 simazine은 흡수된 직후에 신속히 대사되어 약제처리 1, 6, 12시간후에는 흡수된 simazine의 49.5, 52.8, 63.2%가 각각 GSH와 결합된 형태로 대사되었다. 옥수수에서는 같은 처리 기간 동안에 흡수량의 24.2~44.2%정도가 대사되는 경향이였다. 특히 1~6시간 까지의 처리 초기에는 울무에서의 대사속도가 약 2배 정도 옥수수에 비하여 빠르게 나타났다. 두 초종 모두 지상부와 근부에 있어서는 비슷한 흡수와 대사속도를 보였다

(표 1). 일반적으로 식물체내에서 triazine계 제초제의 불활성화는 dealkylation, hydroxylation 및 GSH-conjugation에 의하여 나타나는 것으로 보고되고 있다<sup>2)</sup>. 본 실험 조건에서는 dealkylation과 hydroxylation에 의한 대사산물의 존재를 감지할 수 없었으며, TLC 상에서 확인된 주요 대사산물은 대부분이 GSH-simazine conjugate인 것으로 나타났다. GSH-simazine conjugate은 이후의 반응에서 GSH의 분해로 인하여 cystein-simazine의 형태로 나타나기도 하는데 이러한 형태는 많은 보고에서 이미 언급된 바 있는 아미노산-simazine 결합체<sup>3,15)</sup>인 것으로 추정된다.

Table 1. Distribution of simazine and its GS-conjugate in 4-day-old seedlings of *Coix lacrymajobi* and *Zea mays* 1, 6, and 12 hour after incubation with [<sup>14</sup>C]simazine. See materials and methods.

Species	Incubation period(hr)					
	1		6		12	
	Simazine	GS-conjugate	Simazine	GS-conjugate	Simazine	GS-conjugate
<i>Coix lacryma-jobi</i>	(nmol/g fresh wt) <sup>a</sup>					
Shoot	3.2±1.1	3.6±1.2	10.6±0.8	12.5±2.1	12.9±1.6	13.5±1.3
Root	2.3±0.8	1.8±0.7	9.2±1.2	9.7±1.5	11.8±1.1	10.2±0.9
% of <sup>14</sup> C absorbed	49.5		52.8		63.2	
<i>Zea mays</i>						
Shoot	3.7±0.7	1.0±0.6	7.8±1.5	2.9±0.9	9.2±0.4	7.2±0.6
Root	3.5±0.6	1.3±0.4	7.2±1.1	3.2±0.7	8.7±1.1	6.6±0.7
% of <sup>14</sup> C absorbed	24.2		28.9		44.2	

Values represent the mean ± SE for five replications.

본 결과를 통하여 울무에 흡수된 simazine의 대부분이 식물체내의 GSH과의 conjugation을 통하여 불활성화되며, 이러한 대사 반응이 옥수수에 비하여 울무에서 보다 신속히 진행됨으로써 세포 내에서 simazine의 축적 또는 이동이 감소되고 즉, 활성형 제초제의 절대량 감소를 통하여 두 초종간에 저항성의 차이가 나타나는 것으로 판단된다. 또한 처리 초기에 나타난 울무에서의 흡수의 증대(그림 1)는 식물 내부에서의 신속한 대사에 의한 simazine의 소실(표 1)로 인하여 부분적으로 약제의 확산이 촉진되는 것에 기인한다고 생각된다.

### GSH 함량 및 GST 활성

울무와 옥수수에서 나타나는 simazine에 대한 저항성의 차이가 두 초종에 존재하는 제초제 대사활성의 차이에 근거한다면, 이러한 불활성화 반응에 관여하는 주요 인자들 역시 울무와 옥수수에 있어서 다른 양상으로 내재할 것으로 가정된다. 이에 따라 암소에서 일정기간 생육시킨 울무와 옥수수의 유식물체를 대상으로 각 조직별로 GSH의 함량과 불활성화 반응의 촉매효소인 GST의 활성을 조사하였다.

두 초종 모두 다른 조직에 비하여 초엽부에서 가장 높은 GSH 함량 분포를 보였다. 초종 별로는 옥수수에 비하여 울무에서의 GSH 함량이 전반적으로 높게 나타났으며, 특히 울무의 초엽부(2048 nmol g<sup>-1</sup> fresh wt)와 근부(1254 nmol g<sup>-1</sup> fresh wt)에서 옥수수에 비하여 GSH 함량이 각각 1.5배와 2.3배 높게 분포하였다(표 2). 지금까지 보고된 바에 의하면, GSH 함량 분포와 제초제 저항성 발현과의 상관성을 규정하는데 있어서 상반된 결과들이 제기되고 있다. Simazine과 같은 triazine계 제초제인 atrazine에 대한 저항성을 갖는 잡초종에 있어서는 감수성 종과 GSH 함량에 차이가 없었으며<sup>4)</sup>, 약해경감제(herbicide safener) 등을 처리하여 제초제 저항성이 증진되는 경우에도 GSH 함량 변화는 매우 다양한 양상으로 나타나고 있다<sup>3,10,15)</sup>. 그러나 본 연구에서는 울무와 옥수수 사이에 GSH 함량의 차이가 인정되었는 바, 이러한 차이가 두 초종 간에 나타나는 simazine 불활성화 반응의 차이에 기여하는 것으로 판단된다. 또한 이후의 연구에서는 이러한 함량의 차이를 보다 명확히 이해하기 위하여 울무와 옥수수에 있어서 GSH의 함량 변화에 관여하는 인자들, 즉 glutathione reductase의 활성 변화 등에 관한 조사가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Table 2. Glutathione levels in coleoptile, mesocotyl, meristem, and root of 4-day-old seedlings of *Coix lacryma-jobi* and *Zea mays*. See materials and methods.

Tissue	GSH Content(nmol g <sup>-1</sup> fresh wt) <sup>a</sup>		C/Z <sup>b</sup>
	<i>Coix Lacryma-jobi</i>	<i>Zea mays</i>	
Coleoptile	2048±126	1342±144	1.53
Mesocotyl	987±48	865±56	nd
Meristem	1059±69	947±74	nd
Root	1254±76	538±86	2.33

<sup>a</sup>Values represent the mean ± SE for five replications. <sup>b</sup>The ratio of glutathione content in *Coix lacryma-jobi* and *Zea mays*. nd : not significantly different.

울무와 옥수수에 내재하는 GST 활성은 GST 활성 검정시에 일반적인 기질로서 사용되고 있는 CDNB와 불활성화 대상 제초제인 simazine을 기질로 하여 검정하였다. GST[CDNB] 활성은 초종 간에 차이가 인정되지 않았으나, GST[simazine]활성에 있어서는 옥수수에 비하여 울무의 모든 조직에서 약 2배 정도 높은 활성을 보였다. 두 초종 모두 지상부에서의 GST[simazine] 활성이 근부에 비하여 20~30% 정도 높게 나타났(표 3). 이상의 결과로부터 나타난 두 초종 간의 GSH함량 및 GST 활성의 차이는 옥수수에 비하여 울무에서 simazine에 대한 상대적으로 높은 저항성 지수를 보인 것과 일치하는 경

향이였다. 특히 울무의 경우에는 simazine에 대하여 특이성을 갖는 GST의 활성이 옥수수에 비하여 높게 존재함으로써 simazine에 대한 불활성화 반응이 촉진되는 것으로 판단된다. 또한 불활성화 반응의 기질로서 작용하는 GSH 함량이 울무에서 높게 존재하므로(표 2) 이에 의한 부가적인 GST 활성 증대 및 simazine 대사의 촉진이 나타날 것으로 생각 된다. 이와 유사한 결과로서 Anderson 등<sup>4)</sup>은 GSH 함량에 있어서 감수성 초종과 거의 차이를 보이지 않은 velvetleaf 저항성 종에서 atrazine에 대하여 기질특이성을 갖는 GST isozyme의 활성증대가 있음을 보고하였다. Timmerman<sup>5)</sup>은 옥수수에 제초제의 종류에 따라 다양한 활성 변화를 나타내는 GST isozyme들이 존재하며, 이들의 활성 변화와 기질특이성에 따라 제초제의 대사에 차이가 나타날 수 있다고 보고하였다.

Table 3. Glutathione S-transferase activity with CDNB and simazine as substrate in crude extracts from coleoptile, mesocotyl, meristem, and root of 4-day-old seedlings of *Coix lacryma-jobi* and *Zea mays*. See materials and methods.

Tissue	GST[CDNB] Activity		GST[Simazine] Activity	
	<i>Coix Lacryma-jobi</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Coix Lacryma-jobi</i>	<i>Zea mays</i>
	(mmol/min mg <sup>-1</sup> protein <sup>-1</sup> )		(mmol/min mg <sup>-1</sup> protein <sup>-1</sup> )	
Coleoptile	0.45 ± 0.04	0.38 ± 0.05	1.54 ± 0.18	0.74 ± 0.04
Mesocotyl	0.49 ± 0.07	0.37 ± 0.11	1.32 ± 0.09	0.62 ± 0.07
Meristem	0.48 ± 0.13	0.43 ± 0.06	1.28 ± 0.14	0.64 ± 0.05
Root	0.30 ± 0.06	0.31 ± 0.08	1.09 ± 0.08	0.58 ± 0.04

Values represent the mean ± SE for five replications.

**GST isozyme 활성**

앞서 울무와 옥수수에서 나타난 simazine에 대하여 특이성을 갖는 GST 활성의 차이 (표 3)를 이해하기 위하여 두 초종의 초엽부에서 추출한 조효소액을 FPLC-anion exchange 컬럼에 통과시켜 얻어진 각 여액에 대하여 GST 활성을 조사하였다(그림 2). 울무와 옥수수에서 GST 활성을 나타내는 단백질은 NaCl의 0.5~2.5 M 범위에서 거의 모두 용출되었으며, 울무의 경우에 GST [CDNB] 활성을 보이는 1 개의 피크와 GST[simazine] 활성을 나타내는 3개의 피크가 나타났다. 울무에 있어서 GST[CDNB] 활성 (peak 1)과 GST[simazine] 활성을 보이는 2개 (peak 2, 4) 피크가 옥수수의 활성 피크 (peak a, b, c)와 같은 NaCl 농도범위에서 나타났으며, 옥수수에 비하여 전반적으로 높은 활성을 보였다. 또한 옥수수에서는 나타나지 않은 1개 (peak 3)의 GST[simazine] 활성 피크가 다른 NaCl 농도범위에서 검출되었다. 이 GST[simazine] 활성은 CDNB에 대하여 전혀 활성을 나타내지 않았기 때문에 울무에서 simazine에 대하여 특이성을 갖는 다른 GST isozyme이 존재함을 시사해 주고 있다.

이상의 결과로부터 옥수수의 경우와 유사한 NaCl 농도

범위에서 검정된 GST[simazine] 활성 (peak 2, 4)이 울무에서 다소 높게 존재하며, 옥수수와는 다른 GST isozyme (peak 3)에 의하여 울무의 GST[simazine] 활성이 나타나 있음이 확인되었다. 그러나 옥수수에 비하여 울무에서 상대적으로 높게 나타난 GST[simazine] 활성 (표 3)이 포괄적인 GST 활성 (peak 1, 2, 4)의 변화에 의한 것인지, 다른 하나의 GST isozyme (peak 3) 활성 발현에 의한 것인지는 명확하지 않다. Dean 등<sup>6)</sup>은 옥수수에 존재하는 GST isozyme들의 기질특이성에 의하여 제초제의 종류에 따라서 다양한 활성 변화가 나타난다고 보고하였다. 다른 연구보고<sup>4)</sup>에서는 velvetleaf의 atrazine 감수성 종에 존재하는 GST isozyme의 포괄적인 활성증대를 통하여 저항성이 발현한다고 보고하였다. 따라서 이후의 연구에서는 울무와 옥수수에 존재하는 GST[simazine] isozyme 유전자의 활성 (유전자의 증폭, promoter 및 조절유전자의 발현) 및 유전자의 발현단계 (mRNA 합성속도, mRNA 반감기 및 전사단계의 전반적인 활성)에서 정확한 차이가 구명되어야 할 것으로 판단된다.

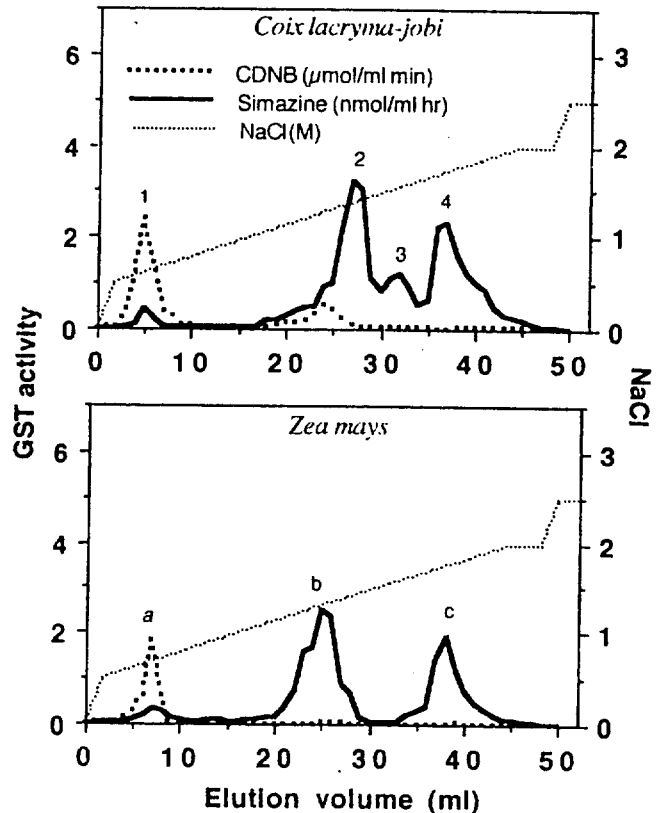


Fig. 2. FPLC-anion-exchange chromatograms for GST activity in coleoptiles excised from *Coix lacryma-jobi* and *Zea mays* seedlings. See materials and methods.

**Thylakoid 전자전달 활성**

Simazine은 작물 및 잡초의 출아 전에 처리되는 토양 처리형 제초제로서 식물체가 왕성한 광합성을 하기 이전에 처리되므로 감수성 초종에서는 생육초기에 흡수된

체초계가 활성형으로 축적되었다가 출아 후에 광합성 저해를 야기하게 된다. 따라서 simazine 저항성인 울무의 경우에는 흡수된 약제가 신속히 불활성화되거나, 작용점 수준에서의 저항성이 존재해야 한다. 이를 토대로 작용점 수준에서 simazine에 대한 감수성 차이를 조사하기 위하여 울무와 옥수수의 완전 엽으로 부터 추출한 thylakoid막을 포함한 배양액에서 DCPIP의 환원 정도에 따라 simazine에 의한 전자전달 억제 양상을 비교하였다.

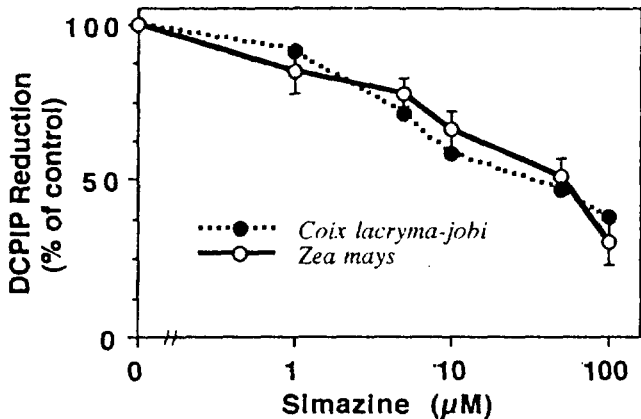


Fig. 3. Effect of simazine on DCPIP reduction in thylakoids isolated from *Coix lacryma-jobi* and *Zea mays*. See materials and methods.

초종별 전자전달 활성은 1~100 μM 수준의 simazine이 처리된 울무와 옥수수의 추출물에서 매우 유사한 경향으로 억제되었다. 이는 울무와 옥수수 간에 작용점에서의 약제에 대한 감수성에는 차이가 없으며, 울무의 simazine에 대한 내성 발현이 작용점에 존재하는 특징적인 차이에서 기인하지 않음을 시사하고 있다. 따라서 이상의 결과들은 울무에 있어서 simazine에 대한 내성 발현이 약제의 흡수 저하 또는 작용점 수준에서의 저항성 기작에 기인하지 않으며, 흡수된 약제가 GSH와의 conjugation에 의하여 신속히 불활성화됨으로써 나타난다는 본 연구의 가설을 잘 뒷받침하는 결과라고 판단된다. 이후의 연구에서는 simazine의 불활성화에 직접적으로 관여하는 GST 활성 이외에, hydroxylation 등에 관여하는 비효소적 불활성화 기구<sup>2)</sup>에 대한 연구도 수행되어야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

울무의 simazine에 대한 내성이 GSH와의 conjugation에 의한 약제의 불활성화 반응에 기인하는지 여부를 검증하기 위하여 같은 화본과 작물인 옥수수와 비교하여 약제의 흡수 및 대사속도, GSH 함량 및 GST 활성, GST isozyme의 발현 양상 및 작용점에서의 약제에 대한 감수성의 차이를 조사하였다. 울무와 옥수수 모두 배양액 중에 포함된 simazine에 대하여 약제처리 초기부터 빠른

흡수를 보였으며, 처리 12 시간 후에는 두 초종 간의 흡수속도에 있어서 차이가 인정되지 않았다. 울무에 흡수된 simazine은 GSH-simazine conjugate의 형태로 신속히 대사되었으며, 특히 약제처리 1~6 시간 까지의 처리 초기에는 울무에서의 대사속도가 옥수수에 비하여 약 2배 정도 빠르게 나타났다. 두 초종 모두 초엽부에서 가장 높은 GSH 함량 분포를 보였다. 초종별로는 울무에서의 GSH 함량이 옥수수에 비하여 전반적으로 높게 나타났으며, 특히 울무의 초엽부와 근부에서 옥수수에 비하여 GSH 함량이 각각 1.5배와 2.3배씩 높게 나타났다. GST [CDNB] 활성은 초종 간에 차이가 인정되지 않았으나, GST[simazine]활성에 있어서는 옥수수에 비하여 울무의 모든 조직에서 약 2배 정도 높은 활성을 보였다. 두 초종 모두 지상부에서의 GST[simazine] 활성이 근부에 비하여 20~30% 정도 높게 나타났다. 울무와 옥수수에서 나타난 simazine에 대하여 특이성을 갖는 GST 활성의 차이를 이해하기 위하여 FPLC-anion exchange 컬럼을 이용하여 GST isozyme 활성을 조사하였다. 울무에 있어서 GST [CDNB] 활성을 보이는 1개 피크와 GST[simazine] 활성을 보이는 2개의 피크가 옥수수의 활성 피크와 같은 NaCl 농도범위에서 나타났으며, 이들의 활성은 옥수수에 비하여 높게 나타났다. 옥수수에서는 나타나지 않은 1개의 GST[simazine] 활성 피크가 울무에서 검출되었으며, 이 GST[simazine] 활성은 CDNB에 대하여 전혀 활성을 나타내지 않았기 때문에 울무에 simazine 특이성의 다른 GST isozyme이 존재함을 시사해 주고 있다. 울무와 옥수수의 완전 엽으로 부터 추출한 엽록체 thylakoid막에 의한 전자전달 활성은 simazine 1~100 μM 수준에서 매우 유사한 경향으로 억제되었다. 이상의 결과들은 울무의 simazine 내성이 흡수된 약제가 GSH와의 conjugation에 의하여 신속히 불활성화됨으로써 나타나며, 이러한 simazine 대사활성의 차이는 식물체에 내재하는 GSH 함량 및 GST 활성과 밀접한 상관성이 있음을 시사해 주고 있다.

## 참 고 문 헌

1. Van Rensen, J.J.S. (1989). Herbicide interacting with photosystem II. In: Herbicides and plant metabolism (A. D. Dodge ed.). pp. 21~36. Cambridge University Press.
2. Hatzios, K.K. and D. Penner (1982). Metabolic reactions and pathways of herbicide metabolism. In: Metabolism of herbicides in higher plants. pp. 15~74. Burgess. Minneapolis.
3. Gronwald, J.W. (1989). Influence of herbicide safeners on herbicide metabolism. In: Crop safeners for herbicides (K. K. Hatzios and R. E. Hoagland, ed.). pp. 103~128. Academic Press.
4. Anderson, M.P. and J.W. Gronwald (1991). Atrazine resis-

- tance in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. *Plant Physiol.* **96**, 104~109.
5. Timmerman, K.P. (1989). Molecular characterization of corn glutathione S-transferase isozymes involved in herbicide detoxification. *Physiol. Plant.* **77**, 465~471.
  6. Dean, J.V., J.W. Gronwald, and M.P. Anderson (1991). Glutathione S-transferase activity in nontreated and CGA-154281-treated Maize shoots. *Z. Naturforsch.* **46c** : 850~855.
  7. Chun, J.C., S.Y. Ma, and D.W. Seo (1994). Determination of tolerant medicinal crops to herbicides and identification of the tolerance-related substance. *RDA J. Agri. Sci. (Agri. Inst. Cooperation)*. **36**, 159~165.
  8. Radosevich, S.R. and J.S. Holt. (1982). Physiological responses and fitness of susceptible and resistant weed biotypes to triazine herbicides. In : *Herbicide resistance in plant* (Lebaron, H. M. and J. Gressel, ed.). pp. 163~184. John Wiley & Sons.
  9. Gronwald, J.W., R.N. Anderson, and C. Yee (1989). Atrazine resistance in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) due to enhanced atrazine detoxification. *Pestic. Biochem. Physiol.* **34**, 149~163.
  10. Chun, J.C. and S.Y. Ma (1995). Investigation of herbicide safeners and their mode of action. II. Effect of N-(4-chlorophenyl) maleide, plant growth regulators, and alkylating agents on glutathione content and glutathione S-transferase activity. *Korean J. Environ. Agric.* **14**(3), 329~337.
  11. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248~251.
  12. Norman, M.A., E.P. Fuerst, R.J. Smeda, and K.C. Vaughn (1993). Evaluation of paraquat resistance mechanisms in *Coryza*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **46**, 236~249.
  13. Arnon, D.I. (1949). Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* **24**, 1-15.
  14. Darr, S., V. Souza-Machado, and C.J. Arntzen (1981). Uniparental inheritance of a chloroplast photosystem II polypeptide controlling herbicide binding. *Biochem. Biophys. Acta.* **634**, 219~222.
  15. Shimabukuro, R.H. (1985). Detoxification of herbicides. In : *Weed physiology, Vol II* (S. O. Duke, ed.). pp. 215~240. CRC Press.