

植物體 組織培養과 除草劑 抵抗性

金 吉 雄*

Herbicide Resistance in Plant Tissue Culture

Kim, Kil Ung*

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate herbicide resistant plant through tissue culture. Callus was induced from embryos of *Echinochloa crusgalli* Beauv. (var. *oryzicola* Ohwi, var. *caudata* Kitagawa and var. *crusgalli*). An optimum medium for callus induction and succinate dehydrogenase activity in induced callus were detected and callus growth of various varieties of *Echinochloa crusgalli* was assessed under the treatment of various rates of butachlor[N-(butoxymethyl)-2-chloro-N-(2,6-diethylphenyl)acetamide]. MS medium seemed to be the most appropriate to induce callus from the embryos of varieties of *E. crusgalli* by using 2,4-D about 5.5mg/l as a hormone source. The activity of succinate dehydrogenase in induced callus showed positive reaction against to TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) regardless of concentrations of butachlor and varieties of *E. crusgalli*, indicating that all the callus induced were alive. The callus growths derived from seeds of *E. crusgalli* were greatly affected by various rates of butachlor and were completely inhibited at the highest concentration of butachlor, $10^{-3}M$, regardless of varieties of *E. crusgalli*. $10^{-6}M$ of butachlor inhibited 24.6% of the callus growth of *E. crusgalli* Beauv. var. *oryzicola* Ohwi, while *E. crusgalli* Beauv. var. *crusgalli* showed 42% of inhibition, showing that there was difference in response of varieties of *E. crusgalli* Beauv. to butachlor.

Key words: succinic dehydrogenase, butachlor, *Echinochloa crusgalli* Beauv., TTC.

結 論

除草劑 使用은 農作業에 없어서는 안될 重要한 補助手段으로 登壇되고 있으며 1966년에 127톤에 不可하던 除草劑 使用量이 1983년에는 51,034톤을 使用하여서 무려 400倍以上 增加하는 傾向을 보이고 있으며 앞으로 더욱 增大될 것으로 思料된다(Kim).¹⁰⁾ 1982년에 消耗된 51,034톤의 除草劑 가운데 70%以上이 一年生에 有效한 마세트(Butachlor) 單一種으로 處理되었다. 同一 除草劑의 連用은 一年生에서 多年生 雜草가 優占하는 方向으로 草種의 遷移와 더불어 除草劑의 藥效가 輕減되지 않았나 하는 主張이나

오고 있는 實情이다(Kim).¹⁰⁾ 除草劑에 對한 藥效輕減은 防除對象 雜草가 처음부터 感受性이 아니든지 또는 藥劑 그 자체에는 아무런 變動이 없으나 對象 雜草가 처음에는 感受性을 보이다가 特定 除草劑의 連用으로 耐性을 지닌 變異種(生態型)의 發現으로 因하여 생겨날 수도 있다.

最近 除草劑에 對한 雜草의 耐性 및 生態型의 發現에 對한 研究가 triazine系 除草劑에 對하여 外國에서 많이 研究 報告되어지고 있다. Gasquez 等^{4,5)}은 쇠비름 및 여뀌가, Ammon¹⁾은 명아주가, Grignac⁷⁾은 피, 바랭이, 강아지풀 등이 triazine系 除草劑에 對해서 耐性을 지닌 生態型이 存在함을 報告한 바 있다. Triazine系 除草劑 이외에도 다른 除草劑에

*慶北大學校 農科大學 農學科.

*Dept. of Agronomy, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 635, Korea.

對한 類似한 報告가 많이 되어 있다. McCall¹¹⁾은 2, 4-D에 對한 장폴, Roche¹⁴⁾은 피가 dalapon에, Giffard¹⁶⁾는 보리가 aslume 種內 選擇性을, Westra¹⁵⁾은 개밀류가 비교적 最近에 開發된 非選擇性 除草劑에 內性을 지닌 生態型이 存在함을 研究 報告하였고, Hanioka⁸⁾는 *Erigeron philadelphicus*가 paraquat에 耐性을 보이는 生態型의 存在함을 報告하였다. 植物 組織培養을 통하여 耐性植物 選擇에 對한 方法을 Chaleff 等⁹⁾이 提示한 바 있고 Hirono,⁹⁾ 竹內¹⁷⁾ 및 松葉恭一¹⁶⁾ 등이 組織培養을 통한 除草劑의 選擇성에 對한 약간의 報告가 있다.

現在 우리 나라에서는 除草劑에 對한 耐性을 지닌 生態型의 研究에 對하여 研究가 試圖되거나 報告된 바가 전혀 없는 實情이다. 이리하여 最近 雜草 草種의 遷移인지 藥效의 輕減인지 防除價가 떨어진 事例가 問題가 되고 있는 時點에 圃場이나 꽃트試驗을 통해서 除草劑에 對한 雜草의 耐性究明이 어렵기 때문에 特定 雜草種으로부터 카루스를 誘導하여 除草劑에 對한 耐性을 檢定하는 데 必要한 基礎的 資料를 얻고 저 본 試驗을 試圖하였다. 本 研究는 韓國科學財團의 研究費 支援('83~'84)으로 推進되었음을 밝혀둔다.

材料 및 方法

試驗 1. 生長調節劑 및 培養培地の 種類가 카루스의 形成에 미치는 影響

MS(Murashige and Skoog), Miller 및 N_6 등의 基本培地에 生長調節劑인 2, 4-D의 含量을 2.75 mg, 5.50mg, 11.00 mg 및 22.00mg/l을 添加한 處理한 LAA를 1.0mg, 2.0mg, 4.0mg 및 8.0mg/l을 添加處理한 培地에다 供試植物로 皮를 使用하였다. 充實한 皮종자를 選擇하여 種皮를 除去한 後 8%의 $Ca(OCl)_2$ 에 20분간 殺菌시킨 後 殺菌水에 3회 水洗한 後 미리 殺菌하여둔 紗레에 물기를 빼고 供試培地 및 生長調節劑를 添加한 培養液 20ml 씩들이 試驗管에 5粒씩 넣어 6反復으로 溫度가 $25 \pm 1^\circ C$ 로 調節되는 定溫恒溫器에서 25日間 暗調件下에서 置床 培養後 發芽率, 誘導頻度 및 生體重을 測定하였다.

試驗 2. 誘導된 카루스의 活力檢定

카루스의 生死 및 活力을 檢定하기 위하여 MS培地의 監類만을 넣어 殺菌한 後 butachlor 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 및 10^{-6} M을 milipore filter로 殺菌하여 添

加한 後 이 溶液의 10ml 씩을 30ml 삼각후라스크에 넣고 繼代培養된 皮 및 벼의 카루스의 小片을 취하여 藥液中에 添加한 後 삼각후라스크를 振盪培養器에 넣고 $30^\circ C$ 調件下에서 매분 약 100회의 回轉數로 약 20時間 振盪培養 後 카루스를 包含한 藥液全部를 호모게나이저로 磨碎한 後 Supernatant을 약 3 ml Thunberg tube 主室에 넣고 副室에는 phosphate buffer와 基質인 Succinate 및 TTC를 包含한 TTC 試藥을 4.5ml 넣고 眞空펌프로 3분간 減壓을 시켜 $37^\circ C$ 로 調定된 恒溫水槽에서 Succinate dehydrogenase의 活性을 TTC 反應으로 調査하여 카루스의 生死를 判定하여 正反應은 +로 表示하였다.

TTC 試藥調製: 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride (1%)

1 ; Succinate - Na_2 (0.2M)

2 ; Phosphate buffer solution (0.1M)

試驗 3. 카루스 培養을 통한 變異種 檢定 (Butachlor 濃度別 카루스 重量增加에 미치는 影響)

MS培地에다 butachlor를 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 및 10^{-6} M을 處理한 後 20ml 씩을 試驗管에 넣고 繼代培養되고 있던 돌피, 물피, 강피 등의 3種의 皮 및 벼의 카루스 小片을 넣고 평량한 後 $25 \pm 1^\circ C$ 로 維持되는 恒溫定溫器의 暗調件下에서 30日間 置床한 後 試驗管全體의 重量을 平량하여 置床直前의 重量을 減한 後 카루스의 生體重 增殖 程度를 調査하였으며 5反復으로 遂行하였다. 카루스로부터 植物體 誘導 및 原形質體 分離에 對하여는 계속 研究中임.

試驗結果 및 考察

카루스 誘導에 미치는 生長調節劑 및 培地の 影響 2, 4-D 및 IAA 含量을 달리하여 培地 種類別로 皮 種子의 胚로부터 誘導된 카루스의 生體重에 미친 影響을 置床後 25日째 調査한 成績은 表 1과 같다. 2, 4-D 含量別로는 培地種類에 關係없이 多小增加되는 傾向을 보이고 있으나 2, 4-D에 比하여 뚜렷한 影響을 나타내지 못하는 것 같으며 IAA와 培地間의 影響을 보면 MS에서는 $1 \sim 4$ mg/l 處理가 Miller 및 N_6 培地는 $2 \sim 8$ mg/l 處理區에서는 良好하나 양쪽 培地 共히 8mg/l 處理區에서 가장 높았다. 皮 種子의 發芽率이 本 試驗에서 43~73% 程度였으며 發芽를 한 種자는 거의 전부 카루스를 生成

Table 1. Effect of 2, 4-D and IAA on callus formation from varieties of *Echinochloa crusgalli* seeds under different mediums.¹⁾

Treatment (mg/l Mediums)	% germination ²⁾			Induction frequency (%) ³⁾			Fresh wt. of callus (mg/seed)		
	MS	Miller	N ₆	MS	Miller	N ₆	MS	Miller	N ₆
2, 4-D 2.75	50.0	62.5	72.5	50.0	60.0	50.0	5.11	4.70	4.07
2, 4-D 5.50	67.5	70.0	71.4	67.5	70.0	68.6	9.66	9.41	4.34
2, 4-D 11.00	55.0	52.5	72.5	55.0	52.5	70.0	4.54	1.66	3.76
2, 4-D 22.00	42.5	57.5	52.5	37.0	55.0	45.0	2.11	4.84	1.78
IAA 1.00	52.5	60.0	65.0	45.0	27.5	15.0	3.20	0.88	0.49
IAA 2.00	60.0	65.7	68.6	35.0	51.4	34.2	2.26	2.60	2.62
IAA 4.00	62.5	45.0	70.0	47.5	45.0	45.0	4.11	3.09	0.75
IAA 8.00	70.0	67.5	72.5	62.5	67.5	57.5	3.08	4.32	3.80
Unt. control	55.0	68.4	81.3	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00

¹⁾ Each value is an average of 5 seeds with 6 replications, and determined at 25 days of incubation.

²⁾ Number of *E. crusgalli* seeds germinated.

³⁾ % of callus induction from seeds.

시킨 것으로 나타났다.

MS 및 Miller 培地 등에서 카루스의 生體重이 높았으며 類似한 傾向을 보였다. 그러나 N₆ 培地는 피種子로부터 카루스 誘導에는 適正하지 못한 것 같았다. 같은 禾本科에 屬하는 벼의 경우는 카루스 誘導을 위해서 MS 培地를 많이 使用하고 있어서 피의 경우도 MS 培地를 使用하면 無難할 것으로 생각된다 (Nam, Ogawa et al.).^{12,13)}

誘導된 카루스의 活力檢定 誘導된 카루스의 生死를 判定하기 위하여 MS 培地の 鹽類만을 넣은 溶液에 butachlor를 添加한 藥液中에 피의 種類別로 誘導된 카루스 및 벼의 카루스를 添加한 後 Succinate dehydrogenase의 活性을 調査한 成績은 表 2와 같으며 供試한 피의 種類間이나 butachlor의 濃度間에 差異가 없이 전 카루스에서 TTC에 正反應(+)을 보여서 酵素의 活性이 있고 誘導된 카루스가 生存해

Table 2. Activity of succinate dehydrogenase in callus culture treated with butachlor.

Plant species	Cone. of butachlor (M)			
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
<i>E. c.</i> ¹⁾ Beauv. var. <i>oryzicola</i>	+ ²⁾	+	+	+
<i>E. c.</i> Beauv. var. <i>caudata</i> Kitagawa	+	+	+	+
<i>E. c.</i> Beauv. var. <i>crusgalli</i>	+	+	+	+
Rice (Miyang 42)	+	+	+	+

¹⁾ *E. c.* = *Echinochloa crusgalli*

²⁾ +: Positive reaction to TTC.

있음을 判明할 수 있으나 butachlor 濃度間에는 TTC 反應만으로 酵素活性의 差異를 究明할 수 없었다. 벼에서도 butachlor의 濃度間에 差異가 없었다. Hirono도 禾本科에 殺草力이 높으나 雙子葉植物에는 藥害가 거의 없는 alloxidium을 피와 콩에 處理하였을지도 피와 콩의 카루스 共히 TTC에 正反應을 보였으며 酵素의 活性差異는 究明될 수 없었으나 카루스가 生存해 있음을 報告하였다.

MS 培地에 butachlor를 10⁻³-10⁻⁶ M을 添加하여 돌피, 물피 및 강피 등에서 誘導된 小片을 넣어 培養後 30 일째에 카루스 增殖에 미친 影響을 無處理에 對한 抑制率로 나타낸 것은 表 3과 같다. 피의 種類에 關係없이 butachlor의 濃度가 增加할수록 카루스의 增殖이 크게 抑制되었으며 10⁻³ M에서는 全 種類의 피의 카루스 誘導가 되지 않았다. 10⁻⁶ M과 같이 低濃度에서는 피 種類間에 差異가 있으며 돌피(*Echinochloa crusgalli*, var. *crusgalli*)가 42% 抑制됨에 比하여 강피(*Echinochloa crusgalli* Beauv. var. *ory-*

카루스 重量增加에 미치는 butachlor의 影響

Table 3. Percentage inhibition of fresh callus weight treated by various rates of butachlor.¹⁾

Varieties	Conc. of butachlor(M)	% inhibition			
		10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
<i>E. c.</i> ³⁾ Beauv. var. <i>oryzicola</i> Ohwi		24.6	61.2	88.7	100.0
<i>E. c.</i> Beauv. var. <i>caudata</i> Kitagawa		38.9	54.9	79.3	100.0
<i>E. c.</i> Beauv. var. <i>crusgalli</i>		42.0	67.3	89.2	100.0

¹⁾Duration of butachlor treatment: 30 days

²⁾% inhibition = (callus wt. of untreated control - callus wt. of the treated) / callus wt. of untreated control × 100

³⁾*E. c.* = *Echinochloa crusgalli*

zicola Ohwi)는 24.6%로 훨씬 적게 억제되는 것으로 보아 피 種類間에 butachlor에 對한 感受性 程度에 差異가 있지 않나 思料된다. 전반적으로 全濃度에서 돌피가 강피나 물피(*Echinochloa crusgalli* Beauv. var. *caudata* Kitagawa)에 比하여 보다 感受性を 나타내고 있는 것 같다. 이와 類似한 研究로 竹內⁸⁾에 依하면 벼 品種群間的 組織培養에서 Indica 型인 IR 8이 Japonica 型인 Nihonbare나 Indica × Japonica의 交雜種인 Milyang 23보다 濃度가 1~300ppm으로 增加될수록 카루스의 重量의 增加가 抑制되어 品種間에 뚜렷한 差異가 있음을 報告하였다. 이와 같은 結果는 같은 屬에 속하나 植物體 品種間에 差異가 있음을 立證해 주고 있다. Hirono⁹⁾는 大豆와 강아지풀 및 바랭이 등에서 誘導된 카루스에 alloxydium을 處理하였을 때 大豆에 比하여 禾本科인 강아지풀 및 바랭이의 카루스 增殖이 현저히 抑制됨을 보여 植物體 種間에 低濃度에서 選擇의 差異가 있음을 報告하였다. 한편으로 같은 禾本科인 강아지풀과 바랭이 간에도 多小의 差異가 있었으며 이들의 差異는 細胞 水準의 本質的인 差異에 起因된 것이 아닌가라고 報告한 바 있다.

以上的 얻어진 研究結果를 綜合해 보면 첫째로 禾本科 雜草인 피에서 카루스 誘導는 MS 培地에다 2, 4-D 5.5mg/l 處理한 것이 가장 좋았으며 둘째로 카루스의 生死與否는 TTC에 butachlor를 處理한 區나 處理하지 않는 區나 共히 正反應(+)을 보여 生存하고 있음을 立證할 수 있었고 셋째로 피 種類間에 물피 및 강피가 돌피에 比하여 여러水準의 butachlor 濃度에 對하여 抑制率의 程度가 낮아서 돌피에 比하여 多小 耐性を 나타내고 있지 않나 思料된다. 이와 같이 피의 種間差異가 昨수 피의 耐性이 發現했다니 除草劑의 藥效가 떨어졌느니 하는 것을 뒷받침해 줄 수 있는 說明이 될 수 있지 않나 思料된다. 一般적으로 논에서는 돌피가 優占하고 있는데 butachlor의 連

續의 處理가 돌피를 防除시킨 반면 물피나 강피는 다 소 耐性を 지녀서 防除가 잘되지 않았거나 相對적으로 增加된 것이 아닌가 推定된다. 耐性의 特性이나 機作은 금후 繼續研究하여 次期에 報告코져 한다.

結 論

植物體 組織培養을 통한 除草劑에 對한 抵抗性 植物體 檢定에 관한 基礎的인 資料를 얻기 위하여 禾本科 雜草인 피의 胚로부터 카루스 誘導에 適定한 生長 調節劑 濃度 및 適定培地를 選定하고 이들 誘導된 카루스에 TTC를 사용하여 succinate dehydrogenase 活性檢定으로 카루스의 生死判別 및 butachlor에 對한 피 種類間的 反應으로 變異種을 檢定하는 등 基礎資料를 얻고져 試驗을 推進하여 얻어진 結果는 다음과 같다.

1. 禾本科 雜草인 피의 胚로부터 카루스를 誘導하는 데는 MS 培地가 適定하였으며, 2, 4-D가 IAA보다 生長調節劑로 效果의이였으며 5.5mg/l 이 適量이었고 發芽가 된 피 種子로부터는 카루스가 거의 모두 誘導되었다.

2. 카루스內에 存在하는 succinate dehydrogenase의 TTC에 對한 活性은 돌피, 물피 및 강피 모두가 butachlor 處理 濃度에 關係없이 正反應을 보여서 誘導된 카루스가 生存하고 있음을 確認할 수 있었다.

3. Butachlor 濃度에 따른 피 種類別 카루스의 重量增加는 10⁻³ M의 高濃度에서는 피 種類에 關係없이 枯死되었으나 低濃度인 10⁻⁶ M에서는 강피가 24.6% 抑制를 보인데 比하여 돌피는 42%의 抑制를 보여 돌피가 보다 感受性を 나타냈다.

引 用 文 獻

1. Ammon, H. U. 1977. Kombination chemisch-

- mechanisch- und biologischer Methoden zur Unkräutbekämpfung im mehrjährigen Maisbau und erste Resultate über die Beeinflussung bodenphysikalischer Kenwerte, Proc. EWRS Symp. Methods of Weed Control and Their Integration. 243.
2. Blein, J. P. 1980. Mise en culture de cellulose de jeunes plantes de *Chenopodium album* sensibles ou résistantes à l'atrazine. *Physiol. Vege.*, 18:703.
 3. Chaleff, R. S. and M. F. Parsons. 1978. Direct selection in vitro for herbicide-resistant mutants of *Nicotiana glauca*, Proc. Natl. Sci. USA. 75:5104.
 4. Gasquez, J. and G. Barralis. 1978. Observation et selection chez *Chenopodium album* L. d'individus résistants aux triazines. *Chemosphere*. 7:911.
 5. Gasquez, J. and J. P. Compoint. 1980. Trios nouvelles mauvaises herbes résistantes aux triazines en France; *Amaranthus retroflexus* s.l., *Chenopodium polyspermum* L., *Polygonum persicaria* L., *Chemosphere*. 9:30.
 6. Giffard, S., H. Gollin and P. Putwain. 1982. Selection for asulam resistance in barley. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. pp. 481-482.
 7. Grignac, P. 1978. The evolution of resistance to herbicide in weedy species. *Agro-ecosystems*. 4:377.
 8. Hanioka, Y. 1983. Paraquat-resistant biotype of *Erigeron philadelphicus* L. in mulberry fields in Saitama. *Weed Research(Japan)*. 28(3):213.
 9. Hirono, Y. and H. Ishikawa. 1981. Selective activity of herbicide, alloxym-sodium. *Chemical Regulation of Plants(Japan)*. 16(2): 137-141.
 10. Kim, Kil Ung. 1983. Resistance of plants to herbicide. *Korean J. of Weed Science*. 4(1): 96-106.
 11. McCall, B., 1954. Are our weeds becoming more resistant to herbicides? *Hawaiian Sugar Technol. Rep.*, 146.
 12. Nam, S. H. 1983. Seed-derived callus culture in rice. IRRI Saturday Seminar. pp. 1-10. The International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
 13. Ogawa, M., S. Yoshida, G. S. Gabusloy, H. C. Ye and K. Suenga. 1982. Induction and selection of salt tolerant mutant rice by plant tissue culture. IRRI Saturday Seminar. pp. 1-22. The International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
 14. Roche, B. F. and T. J. Muzik. 1964. Ecological and physiological study of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. and response of its biotypes to sodium 2,2-dichloropropionate, *Agron. J.*, 56: 155.
 15. Westra, P. and D. L. Wyse. 1978. Physiology, edaphic factors and control of specific weeds. *Proc. NCWCC*. 33:106.
 16. 松葉恭一・松中昭一. 1984. 植物組織培養에 의한 耐性 細胞選抜. *雜草研究(日本)* 29(別):163.
 17. 竹內安智・竹松招夫. 1984. 雜草의 callus에 關한 研究. *雜草研究(日本)* 29(別):165.
 18. 竹內安智. 1985. 日本의 農藥安全使用 및 問題點. 農藥安全使用 세미나 報告書(慶北大學校 農業科學技術研究所) pp. 1-34.
 19. 金吉雄. 1985. 雜草防除와 除草劑의 安全使用. 農藥安全使用 세미나 報告書(慶北大學校 農業科學技術研究所). pp. 87-139.