

Glyphosate에 대한 옥수수 반응의 개선된 검정방법

김진석*, 이병희, 김소희, 민석기, 최정섭
한국화학연구원 생물기능연구팀

An Improved Method to Determine Corn (*Zea mays* L.) Plant Response to Glyphosate

Jin-Seog Kim*, Byung-Hoi Lee, So-Hee Kim, Suk-Ki Min, Jung Sup Choi

Biological Function Research Team, Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT), Daejeon 305-600, Korea.

ABSTRACT Several methods for determining the response of corn to glyphosate were investigated to provide a fast and reliable method for identifying glyphosate-resistant corn *in vivo*. Two bioassays were developed. One assay is named "whole plant/leaf growth assay", in which the herbicide glyphosate is applied on the upper part of 3rd leaf and the growth of herbicide-untreated 4th leaf is measured at 3 day after treatment. In this assay, the leaf growth of conventional corn was inhibited in a dose dependent from 50 to 1600 $\mu\text{g/mL}$ of glyphosate and growth inhibition at 1600 $\mu\text{g/mL}$ was 55% of untreated control. The assay has the potential to be used especially in the case that the primary cause of glyphosate resistance is related with a reduction of the herbicide translocation. Another assay is named "leaf segment/shikimate accumulation assay", in which the four excised leaf segments (4 x 4 mm) are placed in each well of a 48-well microtiter plate containing 200 μL test solution and the amount of shikimate is determined after incubation for 24 h in continuous light at 25°C. In this assay, 0.33% sucrose added to basic test solution enhanced a shikimate accumulation by 3 to 4 times and the shikimate accumulation was linearly occurred from 2 to 8 $\mu\text{g/mL}$ of glyphosate, showing an improved response to the method described by Shaner et al. (2005). The leaf segment/shikimate accumulation assay is simple and robust and has the potential to be used as a high throughput assay in the case that the primary cause of glyphosate resistance is related with EPSPS, target site of the herbicide. Taken together, these two assays would be highly useful to initially select the lines obtained after transformation, to investigate the migration of glyphosate-resistant gene into other weeds and to detect a weedy glyphosate-resistant corn in field.

Key words: Assay, glyphosate-resistant corn, resistance detection, shikimate accumulation, transformation

서 론

Glyphosate는 20년 이상 사용되어온 비선택성 제초제로서 세계적으로 가장 많이 소모되고 있는 화합물중의 하나이다 (Dill 2005). 최근 들어 glyphosate 저항성 식물에 대한 관심이 증대되고 있는데 그 이유는 이들 식물이 실험실 수준이나 포장조건에서 더 많이 취급되어야 할 상황에

접어들었기 때문이다. Glyphosate 저항성 식물의 출현 및 생산은 크게 두 가지 경우에 의해 이루어지고 있다. 첫째는 제초제 연용으로 인해 자연조건에서 glyphosate 저항성 잡초가 유발되는 경우이다. 세계적으로 2005년 현재 6종, hairy fleabane [*Conyza bonariensis* (L.)], horseweed [*Conyza canadensis* (L.)], goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn], italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), rigid ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin), buckhorn plantain (*Plantago lanceolata* L.)이 알려져 있으며 (Heap 2004) 금후 더 많은 저항성 잡초가 보고 되어질 것으로 추정된다.

*Corresponding author Tel 042-860-7026 Fax 042-861-4913
E-mail: jskim@kRICT.re.kr

돌째는 형질전환기법을 통해 인위적으로 glyphosate 저항성 작물이 만들어지고 있다. Glyphosate 저항성 콩이 1996년 처음으로 재배되기 시작한 이후 현재 옥수수, 목화, 캐놀라 등이 상품화 되었으며 (Dill 2005) 기타 작물에 대해서도 계속 연구 개발되고 있는 중이다. 이상과 같은 이유로 glyphosate 저항성 잡초 및 작물들은 향후 증가하게 될 전망이다 따라서 이들의 적정한 관리 및 효율적인 생산이 필요한 상태이다. 이를 위해서는 무엇보다 식물의 glyphosate 감수성 정도를 용이하게 평가할 수 있는 방법이 요구되고 있다.

그동안 glyphosate 활성을 평가하는 방법으로서 다음과 같은 몇 가지가 이용되어 왔었다. 1) 여러 농도의 glyphosate 용액이 함유된 Petri-dish에 종자를 치상한 다음 4-8일 동안 발아시킨 후에 뿌리, 신초 또는 엽초 길이를 측정하는 방법이다 (Duke and Hoagland 1978; Escorial et al. 2001; Perez and Kogan 2003). 이는 신속한 검정이 가능하나 종자를 이용할 수 있는 조건에서만 가능하다. 2) Glyphosate의 작용점인 EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) 효소를 추출하여 *in vitro* 상에서 저해제에 대한 감수성 정도를 측정하는 방법이다. 말레이시아에서 발견된 glyphosate 저항성 왕바랭이 (Baerson et al. 2002)에서처럼 저항성 원인이 작용점상에서의 낮아진 감수성 때문일 경우에는 의미가 있으나 그렇지 않을 경우에는 이용될 수 없다. 한편 효소검정을 위해서는 shikimate-3-phosphate가 필요한데 이를 준비하기 위해서는 특별한 장치들이 필요하기 때문에 많은 연구자들이 용이하게 사용할 수 없다는 단점이 있다. 3) 약 10cm 길이의 옥수수 잎 또는 엽병이 달린 콩 잎 등을 절취하여 glyphosate 용액에 침지한 다음, 생육실에 3일 정도 배양한 후 발현되는 약해 증상을 평가하는 방법이다(Koger et al. 2005). 이는 증상 발현이 뚜렷하지 않을 경우가 있고 조직 상태 및 환경 변화에 따라서 변이가 심하다. 4) Glyphosate 용액이 담긴 96well 또는 관병에 엽절편을 치상하고 1일 정도 배양한 후 shikimate 축적 정도를 생화학적 반응을 통해 평가하는 방법이다 (Singh and Shaner 1998; Shaner et al. 2005). 콩을 비롯한 몇몇 식물에서는 감수성과 저항성 중간의 shikimate 축적량에 높은 차이를 보여 용이하게 사용될 수 있겠지만, 옥수수의 경우에는 glyphosate가 처리된 감수성 조직에서도 shikimate 축적량이 상대적으로 낮아 감수성 여부를 손쉽게 판독하기가 어렵다는 점이 지적되고 있다. 또한 미국에서 발견된 horseweed(Koger and Reddy 2005)나 호주에서 발견된 glyphosate 저항성 rigid ryegrass (Lorraine-Colwill et al. 2003)에서처럼 저항성 원인이 glyphosate의 이행감소 때문일 경우에는 본 방법이 적용되기 어렵다. 5) 면역분석학적 방법을 통해서 검정하는 방법도 소개되어 있다(Stave 2002). 그러나 이는 외래유전자가 도입된 형질전환체의 감별 및 모니터링에 제한적으로 사용된다.

이상에서 보는 바와 같이 glyphosate 저항성 검정을 위해 지금까지 시도된 방법들은 몇 가지로 한정되어 있고, 적용범위도 각 방법별로 제한되어 있는 실정이다. 본 연구는 재배중인 옥수수를 대상으로 glyphosate 감수성 정도를 평가함에 있어서 보다 개선된 방법을 개발하기 위하여 여러 가지 검정 전략을 설정한 후, 이들에 대한 장단점을 검토하여 활용 가능한 우수 검정방법을 확립하고자 실시하였다. 그 결과 보다 개선된 방법 두 가지를 확립하였는 바, 한 가지 방법은 옥수수 제3엽 상단에 약제를 국소 처리한 다음 약제 처리 되지 않았던 제4엽의 신장 정도를 조사하는 것이며, 다른 한 가지 방법은 옥수수 엽절편을 시험용액에 일정기간 치상한 후 shikimate 축적량을 비교 조사하는 것이다.

재료 및 방법

식물재료

옥수수 수원 19호 품종 (*Zea mays* cv. Suweon 19)을 사용하였다.

화합물

경농(주)로부터 분양받은 glyphosate 원제 (순도 60.1%)를 사용하였다.

전식물체-엽생장/황화 검정

10 mM ammonium phosphate (pH 4.4) + 0.1% Tween 20 + 20% acetone 용액으로 여러 농도의 glyphosate 용액을 만들었다. 옥수수 제4본엽이 출현하려고 하는 시기에 제3본엽을 대상으로 신단으로부터 6 cm 떨어진 부분을 기점으로 1.5 x 4 cm 크기의 종이와이퍼 (KimtechKimwipes, Yuhan-Kimberly, Korea)를 올려 놓았다. 그 후 조제된 약제 100 μ L를 종이와이퍼에 처리한 후 어느 정도 마른 시기에 다시 100 μ L를 처리하였다 (따라서 약제처리 부위는 신단으로부터 6~10 cm 었다). 이를 온실 (12시간 광주기, 주간 평균 온도 30°C/야간 평균온도 20°C)에 3일 생육시킨 다음, 제3본엽 기부의 황화 (chlorosis) 정도를 엽록소계 (SPAD502, Minolta, Japan)로 측정하였고, 아울러 약제처리 되지 않았던 제4엽의 신장 정도를 제2본엽 엽절부위부터 측정하였다. Glyphosate 처리 효과는 무처리 대비 억제%로 나타내었다. 모든 실험은 5반복으로 실시하였다.

전식물체-녹화 검정

옥수수 종자를 과중하여 제3본엽이 출현하기 시작할 때까지 온실에 생육시켰다. 제2본엽 기부 부위를 2.5 cm 길이의 알루미늄 호일로 감싸서 3일 동안 유지시켰다. 이렇게

하면 포일로 감싼 부위가 황화상태로 존재하는 바, 이 부위에 호일을 벗긴 후 glyphosate 용액을 처리하였다. 즉, 1.5 x 2 cm 크기의 종이와이퍼를 올려놓은 후, 조제된 약제 [10 mM ammonium phosphate (pH 4.4) + 0.1% Tween 20 + 20% acetone + 여러 농도의 glyphosate 용액] 50 µL를 종이와이퍼에 처리하고 어느 정도 마른 시기에 다시 투여하여 총 150 µL를 처리하였다. 처리된 식물체는 온실조건에 생육시켰다. 약제처리 당시와 처리 후 3일째 사이의 잎 엽록소 함량 변화를 엽록소계로 조사한 후, glyphosate가 녹화 억제에 미치는 효과를 조사하였다. 모든 실험은 5반복으로 실시하였다.

전신엽-괴사/엽색 검정

옥수수 종자를 350 cm² 포트에 12개체씩 파종하여 제3본엽이 30% 신장할 때까지 온실에 생육시켰다. 전개되고 있는 3본엽을 10 cm 길이로 절취하여 실험재료로 사용하였다. Ampicillin (50 µg/mL)이 함유된 10 mM ammonium phosphate (pH 4.4) 용액으로 여러 농도의 glyphosate 용액을 만든 다음, 이를 10 mL 관병에 5 mL씩 분주하였다. 절취한 옥수수 유묘 엽신을 관병에 2 cm 깊이로 침지시킨 후, 생육실 (12시간 광주기, 28°C 항온, 200 µmol m⁻²s⁻¹)에 옮겨 5일 배양하였다. 그 후 잎에 나타난 위조괴사 (necrosis/desiccation) 정도와 자색발현 억제정도 (anthocyanin 축적 억제 정도)를 조사하였다. 약제처리로 인해 나타난 위조괴사 정도는 육안으로 조사하였다. 한편 잎에서의 anthocyanin 함량은 다음과 같이 조사하였다. 즉 엽신 조직을 1% HCl이 함유된 methanol에서 28,000 rpm 속도로 30초 동안 균질화하고 (Polytron PT3000, Kinematica, Switzerland) 27,200 g에서 20분간 원심분리 (J2-21M/E centrifuge, Beckmann, USA) 하였다. 상등액을 취해서 UV-VIS 흡광광도계 (DU65, Beckmann, USA)를 이용하여 528 nm와 657 nm에서의 흡광도를 측정 한 후 다음과 같은 식 (anthocyanin value = A528 - 0.25 x A657)에 의해 안토시아닌 함량의 상대적인 수치를 구하였다 (Kim et al. 2003; Mancinelli 1990). Glyphosate 처리 효과는 무처리 대비 anthocyanin 축적 억제정도(%)로 나타내었다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

엽절편-색소축적 억제 검정

주간 평균온도 30°C, 야간 평균온도 20°C인 온실조건에서 생육한 옥수수 유묘를 사용하였다. 제3본엽이 10% 전개되고 있는 상태의 옥수수 유묘로부터 제2본엽을 절취하고, 증류를 제거한 다음 4 x 4 mm의 절편을 만들었다. 절편 4개씩을 300 µL의 시험용액이 담긴 48 well plate에 3반복 치상하였다. 이 때 시험용액의 조성은 10 mM NH₄H₂PO₄ (pH 4.4) + 0.1% Tween 20 + 0.33% sucrose + 50 µg/mL

ampicillin + 여러 농도의 glyphosate 이었다. 잎 절편이 치상된 plate는 덮개를 하고 증발방지를 위해 투명 랩으로 포장한 다음, 25°C 연속 명조건 (오슬람 램프, 200 µmol m⁻²s⁻¹)에 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 각 well로부터 잎 절편을 모두 수거하여 1% HCl 함유 methanol 1 mL가 함유된 microfuge에 넣고 이를 실온에 1일 두어 색소를 추출하였다. Anthocyanin value (well 내에 있는 절편 4개를 1.0 mL methanol로 추출했을 때의 흡광도)를 구하고 이를 무처리 대비 색소축적 억제%로 환산한 다음, glyphosate 처리 효과를 비교하였다.

엽절편-shikimate 축적 검정

주간 평균온도 30°C, 야간 평균온도 20°C인 온실조건에서 생육한 옥수수 유묘를 사용하였다. 제3본엽이 20% 전개되고 있는 상태의 옥수수 유묘로부터 제3본엽을 절취하고, 증류를 제거한 다음 4 x 4 mm의 절편을 만들었다. 절편 4개씩을 200 µL의 시험용액이 담긴 48 well plate에 3반복 치상하였다. 이 때 시험용액의 조성은 10 mM NH₄H₂PO₄ (pH 4.4) + 0.1% Tween 20 + 증류수 또는 0.33% sucrose + 50 µg/mL ampicillin + 여러 농도의 glyphosate 이었다. 잎 절편이 치상된 plate는 덮개를 하고 증발방지를 위해 투명 랩으로 포장한 다음, 25°C 연속 명조건 (오슬람 램프, 200 µmol m⁻²s⁻¹)에 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 plate를 -20°C로 옮겨 냉동시켰다. 이후 shikimate 추출과 발색은 Koger 등 (2005)에서 기술된 방법과 동일하게 실시하였으며 정량은 사전에 작성된 shikimate 표준곡선을 이용하여 행하였다.

결 과

전식물체-엽생장/황화 검정

Glyphosate는 성장점으로서의 이행성이 매우 양호한 화합물이다 (Anderson 1996; Wallace and Bellinder 1995). 따라서 엽신의 선단에 약제를 처리하면 이행으로 인해 엽신 기부의 녹화가 지연되거나 새로이 출현하는 잎의 생장이 억제되는 증상을 나타낸다. 따라서 glyphosate에 대한 옥수수 반응을 면밀히 조사하기 위하여 제3엽에 약제를 국소처리한 후, 3일 후에 처리엽 기부의 황화 정도를 측정하였다. 무처리에서는 22.42 µg/cm² 엽록소함량을 나타내었다. 이 때 glyphosate 처리에 따른 엽록소 생성억제는 12.5 µg/mL 처리농도에서부터 증가되기 시작하여 400 µg/mL 농도에서 최고의 억제율 (67.8%)을 나타내었다. 아울러 약제처리 되지 않았던 제4엽의 신장 억제정도를 조사한 결과, glyphosate 처리에 따른 엽생장은 50 µg/mL 처리농도에서부터 시작하

여 농도가 증가됨에 따라 억제되었으며 1,600 µg/mL 농도에서의 성장억제율은 무처리 대비 55.5%였다. 이 때 무처리에서는 26.4±2.33 cm의 엽신장을 나타내었다. 결국, 황화증상 발현(엽록소 축적 억제 정도)이 잎 성장억제보다는 glyphosate 처리에 대해 더욱 민감한 반응을 나타내는 경향이 있었다 (Figure 1).

전식물체-녹화 검정

성장중의 잎조직을 암처리하여 황화시킨 후 이를 명조건으로 전환시켜 녹화를 유도하는 과정동안에 glyphosate가 녹화 억제 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 황화된 잎조직을 명조건에 3일 동안 두었을 때 무처리구에서 순수하게 증가된 엽록소 축적량은 8.75±0.47 mg/cm²이었다. 이러한 조건에서 glyphosate 처리에 따른 엽록소 축적량은 125 µg/mL 처리농도에서부터 감소하기 시작되어 1,500 µg/mL 수준에서 가장 낮은 값을 나타내었으며 이를 무처리 대비 억제%로 나타낼 경우 69.5% 이었다 (Figure 2).

엽신-괴사/엽색 검정

왕성하게 생육중인 잎을 일정 길이로 절취하여 glyphosate 용액에 침지한 후 명배양하면 아직 명확하지 않은 기작에 의해 엽신 선단이 위조되면서 잎에 갈변 반점 (necrosis)이 나타난다. 본 시험 조건에서 이러한 증상은 400 µg/mL 이상의 비교적 고농도에서 나타났으며 증상 발현 정도(피해율)는 1,000 µg/mL에서 33.5%로서 비교적 낮은 수준이었다.

한편 본 시험의 배양용액 조건에서는 무처리구의 잎에서 자색발현이 유도되었는데 이는 배양용액 조성 성분들의 불

명확한 기작에 의한 영향 때문인 것으로 추정된다. 이러한 조건에서 glyphosate는 자색발현을 억제시켰는데 그 이유는 자색의 주성분이 anthocyanin으로서 이는 shikimic acid pathway에서 만들어진 coumaryl-CoA를 기질로 하여 생합성되는 바, glyphosate는 shikimic acid pathway의 EPSPS를 저해했기 때문이다 (Steinrücken and Amrhein 1980). 자색색소 축적 억제 정도를 지표로 하여 glyphosate 처리 효과를 조사한 결과, glyphosate 2-16 µg/mL 농도에서 19-90.4% 범위의 정량적 억제반응을 나타내었다 (Figure 3). 이 때 무처리구에서의 anthocyanin value는 0.567±0.037 (생체중 0.1 g을 10 mL methanol로 추출했을 때의 흡광도) 이었다.

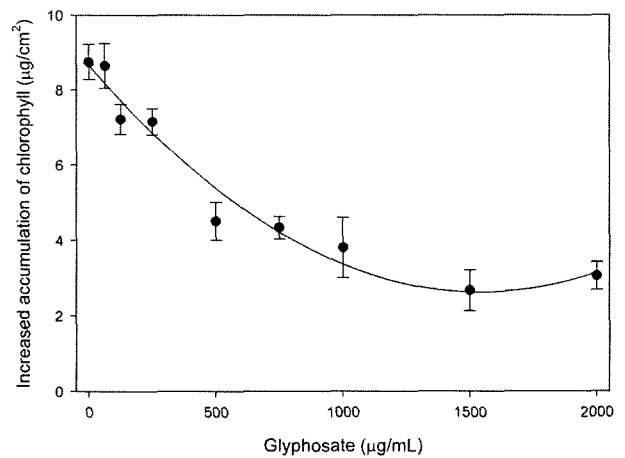


Figure 2. Effect of glyphosate concentration on the chlorophyll accumulation in etiolated part of greenhouse-grown corn leaf. The etiolated part of leaf was induced by covering with aluminium foil for 3 d and after removing the foil, glyphosate was treated on the etiolated part. Chlorophyll contents were determined at 3 d after herbicide treatment. Vertical bars represent the mean±standard deviation of five replicates.

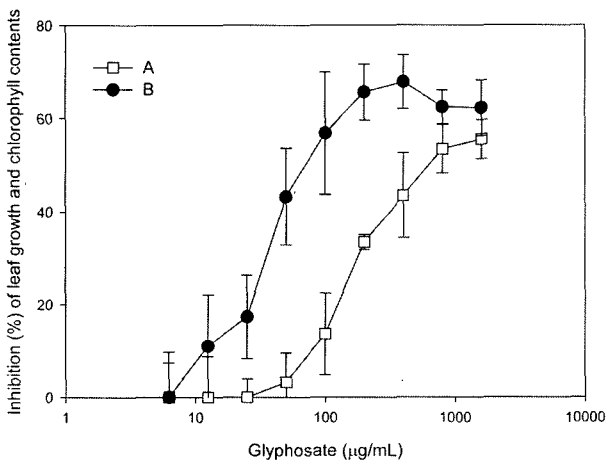


Figure 1. Growth of the fourth leaf (A) and chlorophyll contents of the third leaf (B) in the greenhouse-grown corn treated with glyphosate on the upper part of third leaf. Growth and chlorophyll contents were determined at 3 d after herbicide treatment. Vertical bars represent the mean±standard deviation of five replicates.

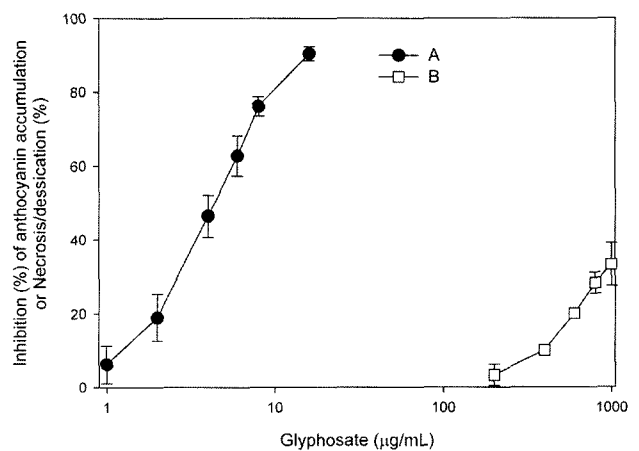


Figure 3. Effect of glyphosate concentration on percent inhibition of anthocyanin accumulation (A) and necrosis/desiccation (B) 5 d after treatment of whole leaves from greenhouse-grown corn. Top 10 cm segment of youngest leaf of three-leaf corn plants were dipped in glyphosate solutions. Vertical bars represent the mean±standard deviation of three replicates.

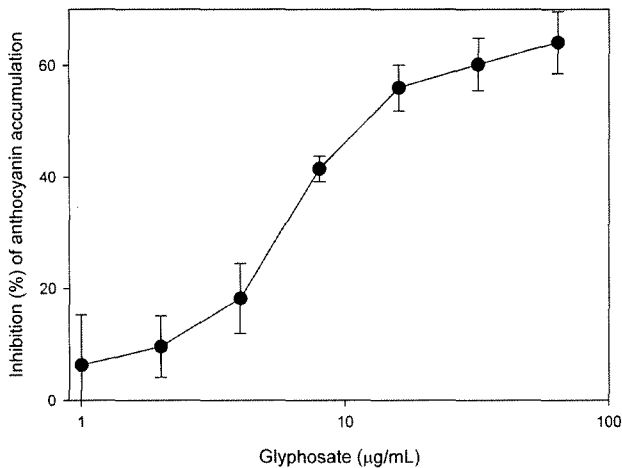


Figure 4. Effect of glyphosate concentration on anthocyanin accumulation in corn leaf segments incubated in the presence of 0.33% sucrose. Leaf segments were obtained from the youngest leaf of three-leaf corn and incubated in test solutions for 24 h at 25°C under continuous light.

엽절편-색소축적 억제 검정

자색색소 축적 억제정도를 지표로 하여 glyphosate 처리 효과를 조사함에 있어서 검정 효율성 제고를 위한 실험규모 축소가능성을 검토하였다. 즉, 생육중인 잎을 일정 길이로 절취하여 사용하는 대신에 작은 크기 (4 x 4 mm)의 잎 절편을 사용하여 48 well plate 상에서의 glyphosate 반응성을 조사하였다. 그 결과, 전신엽-엽색 검정에서와 비슷하게 glyphosate 2-32 µg/mL 농도에서 9.6-60.2% 범위의 정량적 억제반응을 나타내었다 (Figure 4). 이 때 무처리구에 서의 anthocyanin value는 0.286 ± 0.025 이었다.

엽절편-shikimate 축적 검정

Shikimic acid는 glyphosate처리에 의해 식물체내에서 축적되는 것으로 알려져 있다. 그러나 어떤 원인인지 모르나 옥수수는 다른 식물에 비해 축적량이 매우 낮아 shikimic acid 축적 조사를 통한 in vivo assay의 활용에 제한이 있었다 (Koger et al. 2005). 이를 개선하고자 시험용액에 sucrose를 첨가하여 보았는데 그 배경은 sucrose가 anthocyanin 축적을 유도하기 때문에 shikimic acid pathway도 증진시킬 가능성이 있다는 가정에서였다. 시험 결과, sucrose 첨가는 무첨가에 비해 약 3-4배 정도의 shikimic acid 축적 증가를 유도하였다. 그리고 glyphosate 2-8 µg/mL 농도범위에서 직선적 증가반응을 나타내었다 (Figure 5).

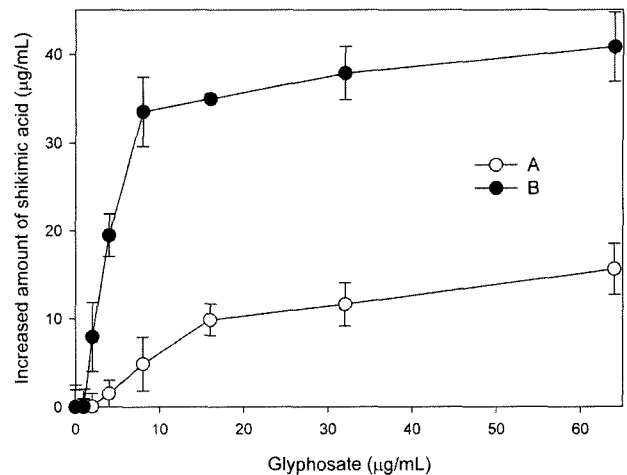


Figure 5. Effect of glyphosate concentration on shikimate levels in corn leaf segments incubated in the absence (A) and presence of sucrose (B). Leaf segments were obtained from the youngest leaf of three-leaf corn and incubated in test solutions for 24 h at 25°C under continuous light.

같은 몇 가지 사항이 고려되어야 한다. 첫째, 저항성 원인에 부합되는 검정법을 확립하여야 정확한 결과를 얻을 수 있다. 현재까지의 보고에 의하면 자연계에서 glyphosate 저항성이 나타나는 원인으로는 작용점의 감수성이 떨어진 경우 (Baerson et al. 2002; Simarmata and Penner 2004)와 glyphosate의 체내이동 감소 (Koger and Reddy 2005; Lorraine-Colwill et al. 2003)를 들 수 있다. 또한 인위적으로 glyphosate 저항성 작물을 제작한 경우 저항성 부여 방법으로서 glyphosate 내성 EPSPS (예, CP14-EPSPS)를 작물에 도입하거나 타 식물의 EPSPS를 세포내 과대발현시키는 전략을 택하였다 (Dill 2005). 따라서 모든 경우를 대변할 수 있는 저항성 검정법을 확립하기 위해서는 적어도 두 가지 원인 즉, 작용점과 관련한 변화와 glyphosate 이동 저하를 고려하여야 한다. 둘째, glyphosate 처리에 의해 나타나는 독특한 증상이 있다면 이를 우선적으로 검토하여야 한다. Glyphosate를 경엽처리하면 그 반응이 신엽에서 가장 먼저 나타나는 바, 생육이 정지되며, 생장이 활발한 부위의 조직이 엽록소 축적 저해로 인해 황화된다. 이어 조직의 위조 피사가 일어나며 때에 따라서는 잎의 색깔 변화가 동반된다. 전반적으로 이들의 외견 증상은 acetolactate synthase 저해제나 acetyl-CoA carboxylase 저해제를 처리했을 때와 매우 유사하며, glyphosate 처리에서만만의 독특한 증상은 관찰되지 않는다. 그러나 식물체내 대사중간산물 축적을 조사할 경우, glyphosate 처리는 저항성에 비해 감수성 식물에서 shikimate 축적이 현저하다 (Shaner and Singh 1998; Shaner et al. 2005). 셋째, 재현성이 좋고 가능한 한 낮은 농도에서 반응하는 생리적 현상을 검정지표로 택하는 것이 바람직하다. 넷째, 검정시 식물재료 요구량이 낮고, 검정 시간 및 노력이 적게 들며, 손쉽게 작업할 수 있는 방법을 개

고 찰

제초제 저항성 검정법을 확립하려면 기본적으로 다음과

발하여야 한다. 이상의 기준들에 준하여 본 연구에서 실시한 여러 가지 검정방법들의 장단점을 사용한 실험재료의 유형에 따라 검토해보면 다음과 같다.

먼저 전식물체 (whole plant)를 이용해서 검정하는 방법으로서 두 가지를 검토하였다. 하나는 옥수수 제3본엽 상단의 일정부위에 약제를 처리한 후 제3본엽 기부부의 chlorosis 정도와 약제처리 되지 않았던 제4엽의 신장 정도를 측정하는 방법이다. 약제처리 후 조사까지의 기간은 3일 정도 필요하였다. 약제처리에 따른 chlorosis가 생장억제 반응보다 낮은 농도에서 나타나는 경향이나 처리농도별 반복간의 변이폭은 chlorosis 반응에서 보다 높았다 (Figure 1). 보통 엽록소 축적은 생육조건과 재배환경 변화에 따라 상대적으로 크게 영향을 받기 때문에 chlorosis 보다는 생장억제 반응을 지표로 하여 조사하는 것이 바람직할 것으로 여겨졌다. 특히 본 검정은 작용점 변화뿐만 아니라 glyphosate 이행 감소가 저항성의 원인인 경우에도 반응을 나타낼 수 있다는 장점을 가진다. 실제적으로 Kim 등 (2005)과 Koo 등(2000)은 이행성이 양호한 제초제들의 이행성을 방사성동위원소를 사용하지 않고서도 본 실험과 유사한 방법으로 조사 가능함을 보고하였다. 전식물체를 이용한 다른 한 검정법으로서, 사전 암처리를 통해 황화시킨 잎조직 일부 부위에 약제를 처리하고 3일 동안 녹화를 유도한 후 약제처리로 인해 나타나는 녹화억제정도를 비교하는 것이었다 (Figure 2). 전반적으로 반복간 변이폭이 큰 편이며 반응감도도 낮고 1,000 µg/mL 이상의 농도에서는 농도의존 반응이 관찰되지 않았다. 사전의 암처리가 필요하며 glyphosate 이행 감소가 저항성의 원인인 경우에는 검정할 수 없다는 단점이 있다.

절취한 엽신을 검정재료로 이용하는 것으로서, 약 10cm 길이의 엽신을 glyphosate 용액에 침지한 후 배양하면서 나타나는 위조/괴사 또는 엽색변화를 조사하는 방법을 검토하였다 (Figure 3). 잎의 위조/괴사 정도를 조사 지표로 하는 경우 적어도 5일의 배양이 필요하였고 400 µg/mL 이상의 농도에서 증상이 나타났으며 그 발현 정도는 1,000 µg/mL에서 33.5%로서 낮은 편이었다. 그러나 잎의 자색발현 억제 정도를 조사지표로 할 경우에는 위조/괴사보다는 낮은 약제농도에서 (2-16 µg/mL) 뚜렷한 정량적 억제반응이 나타났다. 따라서 본 방법을 가지고 검정을 시도하려면 위조/괴사 증상보다는 잎의 자색발현을 지표로 하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다. 본 방법 역시 저항성 원인이 약제이행 감소와 관련되어 있는 경우에는 감수성과 저항성간의 구별이 용이하지 않을 것으로 생각되었고, 만일 잎의 자색정도를 조사지표로 한다면 실험에 소요되는 시료량 또는 실험 공간 등의 측면에서 다른 방법의 검토가 가능하였기 때문에 본 방법은 사용상의 특별한 장점이 없는 것으로 판단되었다.

엽신 절편을 검정재료로 이용하고 anthocyanin 함량 또는 shikimate 축적량을 조사 지표로 검정하는 방법을 검토하였

다. Anthocyanin 축적 억제정도를 조사 지표로 한 경우, glyphosate에 대한 반응은 엽신 침지처리했던 방법에서와 유사하게 glyphosate 2-32 µg/mL 농도에서 9.6-60.2% 범위의 정량적 억제반응을 나타내었다 (Figure 4). 그런데 엽신 침지 검정에 비하여 glyphosate 고농도에서의 자색억제 정도가 낮았는데 이는 시험용액에 0.33% sucrose가 추가되어 자색발현 유도가 더욱 증강되었기 때문으로 추정된다. Sucrose는 anthocyanin 생합성을 증진시키는 것으로 알려져 있다 (Kim et al. 2003). 본 검정은 48 well 상에서 실험하기 때문에 검정 효율성이 매우 우수한 특징을 가진다. 그러나 anthocyanin 생성은 shikimic acid pathway를 통해서 이루어지지만 생합성에는 EPSPS 이외의 요인들도 관여하므로 특수한 경우에는 검정이 불가능할 수 있다. 예를 들면, EPSPS는 정상적으로 작동되나 그 이후의 생합성 단계에서 변이가 일어나거나 전사수준의 돌연변이 때문에 anthocyanin이 생성되지 않는 특징을 갖는 식물에 대해서는 본 검정이 적용될 수 없다. 왜냐하면 이러한 식물은 약제처리에 관계없이 모두 anthocyanin 형성이 일어나지 못할 것이기 때문이다. 한편 배양용액에 sucrose를 추가한 다음 shikimate 축적량을 조사지표로 한 검정법의 경우에는 glyphosate 2-8 µg/mL 농도범위에서 직선적 증가반응을 나타내었다 (Figure 5). 이는 본 연구에서 검토된 여러 가지 방법들 중 가장 민감한 반응을 나타내었고 48 well 상에서 검정하기 때문에 검정 효율성도 우수하였다. 또한 약제처리 후 2일 이내에 검정결과를 얻을 수 있기 때문에 검정속도도 빠르다. 그러나 잎절편을 이용하기 때문에 glyphosate 체내 이행 감소가 저항성의 원인인 식물은 구별해 낼 수 없다는 단점을 가지고 있다.

이상의 결과들에 근거하여 식물재료 요구량, 반응 감도, 검정 소요 시간, 검정 노력, 재현성 등을 고려하여 종합적으로 검토해 볼 때, glyphosate에 대한 저항성 원인이 작용점인 EPSPS와 관련이 있는 경우에는 “엽절편-shikimate 축적 검정”이 가장 바람직 할 것으로 여겨졌다. 그러나 glyphosate에 대한 저항성 원인이 체내이행 감소 때문일 경우에는 시간, 공간 및 노력이 비교적 많이 소요될지라도 “전식물체-엽생장/황화 검정”을 수행하는 것이 좋을 것으로 판단되었다. 따라서 검정 대상 식물에 대한 사전 정보가 전혀 없을 경우에는 두 가지 검정 모두를 이용하는 것이 가장 확실하지만 검정대상 식물에 대한 사전 정보를 보유할 경우에는 그 특징에 따라서 각각의 검정을 선택하는 것이 바람직 할 것이다. 보다 구체적인 이용 방안으로서 본 방법들은 glyphosate 저항성 옥수수를 창출할 경우 형질전환 여부를 비교과적으로 검정하는데에 이용될 수 있다. 또한 형질전환 옥수수를 포장 재배했을 때, 저항성 유전자의 타 식물로의 이동여부를 모니터링하든지 잡초화된 저항성 옥수수 존재여부를 감별하는데 활용될 수 있을 것이다. 한편 본 검정방법의 전략은 다른 화본과 식물에 대해서도 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

본 연구에서는 옥수수를 대상으로 glyphosate에 대한 여러 가지 생리적 반응을 검토한 후, glyphosate 저항성 평가에 활용될 수 있는 보다 개선된 방법 두 가지를 확립하였다. 한 가지 방법은 옥수수 제3엽 상단에 약제를 국소 처리한 다음, 처리 후 3일째에 약제처리 되지 않았던 제4엽의 신장 정도를 조사하는 것이다 (전식물체-엽생장 검정). 이 경우 glyphosate 50-1,600 µg/mL 범위에서 농도가 증가됨에 따라 엽 생장이 억제되었으며, 1,600 µg/mL 농도에서의 생장 억제율은 무처리 대비 55.5%였다. 다른 한 가지 방법은 옥수수 제3본엽의 엽절편 (4 x 4 mm) 4개씩을 200 µL의 시험용액이 담긴 48 well plate에 치상한 후 25°C 연속 명조조건에 24시간동안 배양하여 shikimate 축적량을 조사하는 것이다 (엽절편-shikimate 축적 검정). 이 경우 시험용액에 0.33% sucrose를 가하면 무첨가에 비해 약 3-4배 정도의 shikimate 축적 증가가 관찰되었고 glyphosate 2-8 µg/mL 농도범위에서 직선적 증가반응을 나타내어 기존방법 (Shaner et al. 2005)보다 개선된 특징을 보였다. 본 방법들은 glyphosate 저항성 옥수수를 창출할 때 또는 저항성 유전자의 타 식물로의 이동여부와 잡초화된 저항성 옥수수 존재여부를 감별하는데 활용될 수 있을 것이다. 이 때 glyphosate에 대한 저항성 원인이 작용점 EPSPS와 관련이 있는 경우에는 “엽절편-shikimate 축적 검정”이 가장 바람직하고, 저항성 원인이 체내이행 감소 때문일 경우에는 “전식물체-엽생장 검정” 수행이 필요하다.

사 사

본 연구는 바이오그린21사업 (BioGreen21)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Anderson WP (1996) Weed science principles and applications, Ed 3, West Publishing Company, St. Paul, p. 257
- Baerson SR, Rodriguez DJ, Tran M, Feng Y, Biest NA, Dill GM (2002) Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol* 129: 1265-1275
- Dill GM (2005) Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Manag Sci* 61: 219-224
- Duke SO, Hoagland RE (1978) Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. I. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in dark-grown maize roots. *Plant Sci Lett* 11: 185-190
- Escorial MC, Sixto H, Garcia-Baudin JM, Chueca MC (2001) A rapid method to determine cereal plant response to glyphosate. *Weed Tech* 15: 697-702
- Heap I (2004) The international survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.com>.
- Kim JS, Lee BH, Lee JA, Oh KH, Cho KY (2003) A novel bioassay system for screening of compounds affecting anthocyanin biosynthesis pathway in white corn leaf segment. *Kor J Plant Biotech* 30(2): 207-214
- Kim JS, Oh JI, Kim TJ, Pyon JY, Cho KY (2005) Physiological basis of differential phytotoxic activity between fenoxaprop-P-ethyl and cyhalofop-butyl-treated barnyardgrass. *Weed Biol Manag* 5: 39-45
- Koger CH, Reddy KN (2005) Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci* 53: 84-89
- Koger CH, Shaner DL, Henry WB, Nadler-Hassar T, Thomas WE, Wilcut JW (2005) Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci* 53: 438-445
- Koo SJ, Kim JS, Kim TJ (2000) A simple bioassay to measure herbicide translocation in plants. *Kor J Weed Sci* 20(3): 217-224
- Lorraine-Colwill DF, Powels SB, Hawkes TR, Hollinshead PH, Warner SAJ, Preston C (2003) Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic Biochem Physiol* 74: 62-72
- Mancinelli AL (1990) Interaction between light quality and light quantity in the photoregulation of anthocyanin production. *Plant Physiol* 92: 1191-1195
- Perez A, Kogan M (2003) Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Res* 43: 12-19
- Shaner DL, Nadler-Hassar T, Henry WB, Koger CH (2005) A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Sci* 53: 769-774
- Singh BJ, Shaner DE (1998) Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technol* 12: 527-530
- Simarmata M, Penner D (2004) Role of EPSP synthase in glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud.). *Weed Sci Am. Abstr* 44: 34
- Stave JW (2002) Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. *J AOAC Int* 85: 780 - 786
- Steinrücken HC, Amrhein N (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94: 1207-1212
- Wallace RW, Bellinder RR (1995) Glyphosate absorption and translocation in rust-infected quackgrass (*Elytrigia repense*). *Weed Sci* 43: 1-6

(접수일자 2006년 1월 10일, 수리일자 2006년 2월 15일)