

## 알팔파의 Glyphosate 저항성 세포주 선발

柳點鎬\*

全北大學校 農科大學 農學科

### Selection of Glyphosate Resistant Cell Lines in Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

RYU, Jeom Ho\*

College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea \* Corresponding author

Calli were induced from the cotyledon and the hypocotyl of alfalfa and the callus lines were tested for the resistance to glyphosate in the liquid medium containing 0.01 - 3.00 mM glyphosate. Some resistant cell lines were selected from the gradual increase of glyphosate concentration and the lines resistant to 10 mM glyphosate were analyzed with EPSPS activity.

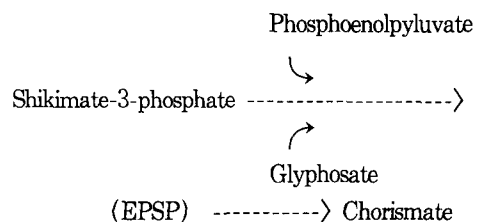
Vigorous callus proliferation from the cotyledon and the hypocotyl was observed from the MS medium containing 1 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L kinetin. The hypocotyl was thought to be better explant source for callus induction than the cotyledon. ID<sub>50</sub> (Inhibition Dosage of 50%) to glyphosate was between 0.1 mM and 0.2 mM level. A49-10G and A58-10G cell lines selected as resistant to 10 mM glyphosate had 8.0 and 9.1 fold increased EPSPS activity to those of the control lines, respectively.

**Key words:** EPSPS (5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)

여러 작물에 있어서 병충해와 잡초에 의한 생산량 감소는 50%에 이르는 경우도 있다. 따라서 잡초에 의한 수량감소는 제초제 저항성 작물을 육성하거나 화학적 제초제에 의한 잡초방제가 농업생산에 필요 불가결한 요소이다. 그러나 제초제가 완전히 선택적으로 작용하지 못할 경우는 약간의 제초제 농도나 환경변화의 차이에 의해 작물의 약제 피해는 매우 심각할 뿐만 아니라 잡초도 방제할 수 없는 경우도 있다. 따라서 제초제 저항성 작물의 육성이 필요하다. 제초제 저항성 작물은 약제의 흡수를 감소시키거나, 체내 보유기간이 짧거나, 다른 물질로 전이하거나, 영양번식성이 크거나 혹은 작용부위를 바꾸는 특성을 가지고 있다.

glyphosate는 몬산토 회사에서 라운드업으로 개발된 광범위 비선택성 엽면살포용 제초제 성분으로 동물에는 독성이 없고 비활성이며 토양에 처리하면 미생물에 의해 신속히 토양내에서 분해되는 특성을 가지고 있어 잔류독성이 없으며 값이 저렴하고 작용성이 광범위하며 비선택적이어서 농가에서 많이 사용된다.

앞서와 같이 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(EPSPS)는 phenylalanine, tyrosine, t-tryptophan 등의



방향족 아미노산을 생성하는 shikimate 경로에서 shikimate-3-phosphate(S-3-P)와 phosphoenolpyruvate(PEP)를 농축하여 EPSPS와 무기인산을 방출하는 효소인데, glyphosate를 처리하면 작물의 생체내에서 EPSPS의 활성이 억제되어 결국 방향족 아미노산의 생성을 억제하여 더이상의 대사과정의 진행이 정지되어 작물체를 서서히 고사시키는 제초제이다.

Giuseppe 등(1994)은 옥수수, Ream 등(1988)은 수수, Shyr 등(1993)은 당근, Smith 등(1986)은 토마토, Steinruken 등(1986)은 페튜니아 등 각기 다른 작물을 대상으로 하여 glyphosate 저항성에 대한 기작을 구명하려 하였으나 알팔파

에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다. 알팔파는 중요 사료작물의 하나로 체세포배 발생이 용이하고 식물체 재분화가 쉬워서 변이체 연구에 많이 이용되고 있다.

따라서, 본 실험에서는 알팔파에 대한 저항성 식물을 육성하여 관련효소의 작용성과 대사과정을 이해하고 더 나아가 저항성 유전자를 분리하여 다른 작물에 전이하여 이용하는 데 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 캘러스 유도

연구재료로 사용한 알팔파 품종은 Vernal로 종자를 Clorox와 70% 에틸알콜에 차례로 표면 살균한 후 25°C 정온기에 넣고 식물생장 조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS배지에서 발아시킨 7-10일 후 자엽과 하배축을 캘러스 유기배지(Table 1)에 옮겼다. 옮길 때의 자엽은 길이 6-7 mm, 폭은 2-3 mm이었으며 하배축은 길이 5 mm이었다.

### 저항성 캘러스 선발

유기된 캘러스를 액체배지에 옮겨 3-4일 배양 후 glyphosate가 0.01 mM에서부터 3.0 mM농도 까지 함유된 액체배지에서 현탁배양세포의 생장억제효과를 조사하고 최초 0.2 mM에서 전체조합의 캘러스를 검정하였다. 이후 액체배양을 계속하며 배지중의 캘러스가 50% 이상 살 수 있는 glyphosate 농도를 점점 올라가며 2주마다 현탁배양을 계속하며 10 mM까지의 저항성 캘러스를 선발하고 6개월 이상을 계대배양하였다.

### EPSP synthase 활성조사

배양 7일째의 현탁배양 세포를 여과지로 진공 여과한 후 시료 0.5 g을 액체질소에서 갈아 4배(w/v)의 50 mM Tris HCl 완충액(pH 7.2)(1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA 및 0.1 g PVP/mL함유)에서 0°C에서 30분간 추출 후 4점의 cheesecloth에 거른 후 15,000 x g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 45-60% 포화 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액에 침전시킨 후 Sephadex 50-G column에서 1,000 x g으로 3분간 원심분리하고 얼음에 보관하고 반응액은 PEP완충액, S-3-P용액, <sup>14</sup>C-PEP반응액을 만들어 25°C에서 15분 반응시킨 후 Dyer 등(1988)의 방법에 따라 즉시 EPSPS활성 측정에 이용하였다.

EPSPS활성은 60 mM Tris malate (pH 6.5), 10 mM KF, 0.6 mM PEP, 0.5 mM shikimate-3-phosphate와 효소를 혼합 총 0.5 mL로 하였다. 효소활성의 단위는 1분당 반응액 (PEP)이 1 M의 생성과 소멸에 촉매하는데 소요되는 단백질

**Table 1.** Combination of plant growth regulators in MS medium for callus induction of alfalfa.

	Growth regulators & concentration (mg/L)	Kinetin			
		0.5	1.0	2.0	3.0
24-D	0.5	①	②	④	⑦
	1.0		③	⑤	⑧
	2.0			⑥	⑨
	3.0				⑩

○ : Growth regulator combination number.

질의 양으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 캘러스 유기

캘러스의 유기는 하배축이 자엽보다 빠르고 유기율도 높았으며, 자엽은 배양 4-5일부터 변화되기 시작하여 2주 후에는 14~78%, 3주 후에는 75~100%가 유기되었다(Table 2). 식물 생장조절제 처리는 24-D 1-2 mg/L와 kinetin 0.5-1.0 mg/L 처리에서 높은 유기율을 나타내었다. 특히 24-D 1.0 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L조합구가 유기율이 가장 높았다. 하배축은 자엽보다 캘러스유기가 빠르고 고르며 높은 유기율을 보여 배양 2주 후에는 61-100%, 3주 후에는 83-100%이었다. Lupotto(1983) 역시 본 시험의 결과와 같이 하배축이 자엽보다 캘러스 유기가 양호하다고 보고한 바 있다. 식물 생장조절제 조합별로는 자엽과 유사하게 24-D 1-2 mg/L kinetin 0.5-1.0 mg/L에서 빠르고 높은 유기율을 보여주었다. Walker 등(1978)은 알팔파 배양시 식물체 재분화시에 24-D함량이 높고 kinetin함량이 낮으면 shoot가, 반대로 24-D함량은 낮고 kinetin이 높으면 root가 형성된다고 하였으나 본 시험에서는 직접 재분화를 볼 수 없었다.

### 저항성 세포의 선발 및 육성

고체배지에서 유기된 캘러스를 24-D 1mg/L, kinetin 0.5 mg/L 및 0.01-3.00 mM glyphosate를 첨가한 액체배지에 옮겨 배양하여 저항성을 검정하였는데, ID50 (inhibition dosage 50%)을 결정하기 위하여 최초 현탁배양 세포 5ml를 50 ml 액체배지에 접종하여 1주일간 배양 후 여과하여 물기를 제거하고 생체중을 조사한 결과는 표 3과 같다. glyphosate 0.01 mM에서는 대조구에 비해 평균 6.3%의 생장(생체중)이 억제되기 시작하여 농도가 높아질수록 급격히 더욱 높은 억제를 보였다. 0.10 mM에서는 대조구의 45.7%, 0.20 mM에서는 57.5%를 보여 ID50은 0.10과 0.20 mM사이

**Table 2.** Effect of 2,4-D and kinetin on the callus induction from the cotyledon and hypocotylat 2-3 weeks after inoculation.

No.	Growth regulators(mg/L)		Cotyledon				Hypocotyl			
	2,4-D,	Kinetin	2 week		3 week		2 week		3 week	
			A <sup>a</sup> / B <sup>b</sup>	rate(%)	A / B	rate(%)	A / B	rate(%)	A / B	rate(%)
1	0.5	0.5	10 / 30	33	50 / 60	83	270 / 300	90	280 / 280	100
2	1.0	0.5	20 / 40	50	20 / 20	100	230 / 230	100	230 / 230	100
3	1.0	1.0	70 / 120	58	90 / 100	90	200 / 310	65	260 / 300	87
4	2.0	0.5	50 / 90	56	80 / 90	89	110 / 120	92	190 / 200	95
5	2.0	1.0	180 / 230	78	140 / 150	93	270 / 300	90	180 / 180	100
6	2.0	2.0	40 / 190	21	140 / 180	78	280 / 380	74	350 / 380	92
7	3.0	0.5	40 / 280	14	290 / 300	97	230 / 310	74	370 / 370	100
8	3.0	1.0	100 / 250	40	150 / 200	75	240 / 340	71	280 / 320	88
9	3.0	2.0	40 / 130	31	120 / 150	80	110 / 180	61	150 / 180	83
10	3.0	3.0	20 / 40	50	40 / 50	80	70 / 80	88	50 / 50	100

a: Number of callus induction, b: Number of explants.

**Table 3.** Growth Inhibition of alfalfa cell lines at 1 week after glyphosate treatment in suspension culture. (g/flask)

Lines	Inhibition	Glyphosate concentration( mM)							
		0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.60	1.00	3.00
A3	Mean	7.65	6.89	4.45	3.72	3.43	0.99	0.94	0.60
	GI <sup>a</sup> (%)	0	9.9	41.8	51.4	55.2	87.1	87.7	92.2
A4	Mean	11.76	10.75	8.93	4.49	3.10	1.72	1.00	0.88
	GI (%)	0	8.6	24.1	61.8	73.6	85.4	91.5	92.5
A49	Mean	18.25	18.20	15.09	11.99	10.50	3.23	1.96	1.21
	GI (%)	0	0.3	17.3	34.3	42.5	82.3	89.3	93.4
A58	Mean	7.25	6.88	5.28	2.92	1.47	0.71	0.63	0.50
	GI (%)	0	5.1	27.2	61.1	79.7	90.2	91.3	92.2
A100	Mean	6.86	5.70	5.51	5.00	3.48	2.38	1.58	0.61
	GI (%)	0	16.9	19.7	27.1	49.3	65.3	77.0	91.1
Total	Mean	10.35	9.70	7.85	5.62	4.40	1.81	1.22	0.82
	GI (%)	0	6.3	24.2	45.7	57.5	82.5	88.2	92.1

a : Growth Inhibition rate (100-(treated cell weight / untreated cell weight × 100)).

에 있었다. 그리고 0.6 mM에서는 82.5%, 1.0 mM에서는 88.2%, 3.0 mM에서는 92.1%의 심한 생육장해를 받아 현탁 세포가 사멸되어 갈색으로 변화되었으며 드문드문 살아 남은 캘러스는 파란색을 보이며 생육이 정지되다가 시간이 경과하면 다시 성장하기 시작하였다. 하배측에서 유래된 캘러스는 캘러스 생성은 빨랐지만 자엽에서 유래된 캘러스보다 glyphosate에 대한 저항성이 낮아 거의 사멸되었다. Nafziger 등(1983, 1984)과 Killmer(1981)는 aspartate첨가가, Haderlie 등(1977)은 phenylalanine, tyrosine 및 tryptophan의 첨가는 glyphosate처리에 따른 세포의 억제를 감소시킨다고 하였다. 따라서 ID<sub>50</sub> 이상의 농도를 점차 배양으로 올려가며 선발을 계속 하였다(Table 4). 최초에는 생장이 심하게 억제되었으나 선발된 세포주를 계속 배양하면 얼마 후 정상적인 생육을 보였다. 1차에는 0.5 mM 농도에서 140개의 세포주를 공시하여 57%인 80개의 세포주를 선발하였고 1.0 mM에서는 24세포주를, 2.0 mM에서는 12세포주를, 5.0 mM

**Table 4.** Selection of alfalfa cell lines surviving at various content of glyphosate suspension culture.

Glyphosate (mM)	No. of tested lines	Selected lines		
		No.	Rate(%)	Rate to total
0.5	140	80	57	57
1.0	80	24	30	17
2.0	24	12	50	9
5.0	12	6	50	4
10.0	16	3	50	2

**Table 5.** EPSP synthase activity of selected callus lines.

Selected lines	EPSP synthase activity	
	pkat <sup>c</sup> /mg protein	Increase of activity to control
A49 <sup>a</sup>	490	1.0
A49-10G <sup>b</sup>	3,920	8.0
A58 <sup>a</sup>	380	1.0
A58-10G <sup>b</sup>	3,458	9.1
A100 <sup>a</sup>	536	1.0
A100-10G <sup>b</sup>	2,680	5.0

a: alfalfa cell lines in control medium.

b: alfalfa cell lines resistant to 10 mM glyphosate.

c: pico katal (A unit of enzyme activity that transforms one mole of substrate per second under defined conditions).

에서 6세포주를, 10 mM에서 3세포주(전체의 2%)를 선발하였으며 이들은 10 mM의 glyphosate에 6개월 이상 계대배양된 저항성 세포주로 A49-10G, A58-10G 및 A100-10G 등이었다.

**EPSPS의활성**

선발된 세포주에 대한 EPSPS 활성을 조사한 결과 표 5

와 같다. A49, A58 및 A100은 glyphosate를 처리하지 않은 대조계통이며 A49-10G, A58-10G 및 A100-10G는 glyphosate 10 mM에서 선발된 저항성 세포주들이다. EPSPS 활성의 절대량에서는 A49-10G가 3,920 pkat/mg protein으로 가장 높았으며 대조계통에 비해서는 8.0배의 높은 활성을 보였다. 또한 A58-10G는 대조계통에 비해 9.1배가 높아서 저항성에서는 A49-10G보다 약간 높은 결과를 보였다.

## 적 요

알팔파의 자엽과 하배축을 배양하여 캘러스를 유기하고 이들을 glyphosate첨가 액체배지에서 배양하여 glyphosate에 대한 생장억제 반응을 검사하였으며 10 mM glyphosate에 저항성인 세포주를 선발하고 EPSPS 활성을 조사 하였던 바 캘러스 유기율은 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0.5 mg/L에서 가장 높았고 자엽보다 하배축이 캘러스 유기율이 높았으며, glyphosate 농도에 대한 ID<sub>50</sub>은 0.1 mM과 0.2 mM 사이에 있었다. A49-10G와 A58-10G는 대조세포주에 비해 각각 8.0배와 9.1배의 높은 EPSPS 활성을 보였다.

사시-본 연구는 1994년도 전북대학교 학술장학재단 지원에 의한 해외연구 결과이다.

## 인 용 문 헌

- Dyer WE, Weller ET, Bressan RA, Herrmann KM (1988) Glyphosate tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L). *Plant Physiol* **88**: 661-666
- Forlani G, Parisi B, Nielsen E (1994) 5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphatesynthase from *Zea mays* cultured cells. *Plant Physiol* **105**: 1107-1114
- Haderlie LC, Widholm JM, Slife FW (1977) Effect of glyphosate on carrot and tobacco cells. *Plant Physiol* **60**: 40-43
- Killmer J, Widholm J, Slife F (1981) Reversal of glyphosate inhibition of carrot cell culture growth by glycolytic intermediates and organic and amino acids. *Plant Physiol* **68**: 1299-1302
- Lupotto E (1983) Propagation of an embryogenic culture of *Medicago sativa* L. *Z Pflanzphysiol Bd* **111**:S. 95-104
- Nafziger ED, Widholm JM, Steinruken HC, Slife FW (1983) Effect of aspartate and other compounds on glyphosate uptake and growth inhibition in cultured carrot cells. *Plant Physiol* **71**: 623-626
- Nafziger ED, Widholm JM, Steinruken HC, Killmer JL (1984) Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to glyphosate. *Plant Physiol* **76**: 571-574
- Ream JE, Steinruken HC, Potter CA, Sikoski Ja (1988) Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from dark-grown seedlings of sorghum bicolor. *Plant Physiol* **87**: 232-238
- Shyr YJ, Caretto S, Widholm JM (1993) Characterization of the glyphosate selection of carrot suspension cultures resulting in gene amplification. *Plant Sci* **88**: 219-228
- Smith CM, Pratt D, Thompson GA (1986) Increased 5-enolpyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase activity in a glyphosate tolerant variant strain of tomato cells. *Plant Cell Rep* **5**: 298-301
- Steinruken HC, Schulz A, Amrhein N, Porter CA, Fraley RT (1986) Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant petunia hybrida cell line. *Arc of Biochem and Biophys* **244**: 169-178
- Walker KA, Yu PC, Sato SJ, Jaworski EG (1978) The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. cultured *in vitro*. *Amer J Bot* **65**: 654-659

(1997년 7월 7일 접수)