

## 광엽잡초 물옥잠의 Sulfonylurea 제초제에 대한 저항성 작용기작

박태선\* · 임양빈 · 경기성 · 이수현 · 박재음 · 김태완<sup>1</sup> · 김길웅<sup>2</sup>

농업과학기술원 작물보호부, <sup>1</sup>한경대학교 농업생명과학대학, <sup>2</sup>경북대학교 농업생명과학대학

**요 약** : 본 실험은 한국 논에서 발생하고 있는 물옥잠의 SU계 제초제에 대한 저항성 메카니즘을 구명하기 위하여 ALS 활성, [<sup>14</sup>C]bensulfuron의 흡수이행 및 ALS 유전자의 DNA 염기서열을 분석하였다. 한국 논에서 광범위하게 사용 중인 6 종류의 SU계 제초제들에 대하여 저항성이 확인되었는데, 저항성 생태형에 대한 생체중 50% 저해 제초제 농도(GR<sub>50</sub>)는 감수성 생태형에 비하여 약 4배에서 64배까지 높았다. SU계 제초제들에 대한 저항성 생태형의 ALS 활성은 감수성 생태형 보다 훨씬 덜 민감하게 반응하였으며, 저항성 생태형에 대한 SU계 제초제들의 I<sub>50</sub>값은 감수성 생태형 보다 14배에서 76배까지 높게 나타났다. 생태형간 ALS 활성 차이의 원인을 구명하기 위하여 [<sup>14</sup>C]bensulfuron의 흡수이행 차이를 조사한 결과 생태형간 뚜렷한 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 저항성 및 감수성 생태형의 ALS 유전자 염기서열을 분석한 결과 저항성 생태형의 ALS 유전자 아미노산 서열 중 각각 하나의 염기치환에 의하여 168번째 threonine이 serine으로, 189번째 histidine이 arginine로, 247번째 aspartic acid가 glutamic acid로 변이 된 것이 확인되었다.(2003년 11월 3일 접수, 2003년 12월 23일 수리)

**Key words** : Sulfonylurea, resistance, *Monochoria korsakowii*, bensulfuron-methyl, mechanism, ALS, DNA.

### 서 론

최근 단일작물의 재배 면적이 확대되고 이들 작물이 연작됨에 따라 동일 작용기작을 가진 제초제들이 연용되고 있는 실정이다(박 등, 1999; Adkins 등, 1997). 또한 제초제 사용경향은 적은 양으로 높은 효과를 나타낼 뿐만 아니라 약효 지속성이 긴 제초제들이 광범위하게 사용되고 있다(박 등, 2001; Itoh, 2000; Heap, 1997). 그러나 약효가 높고 지속성이 긴 동일계통의 제초제를 연속적으로 사용할 경우 저항성 잡초 발생의 주요한 원인이 된다고 보고되었다(Heap, 2003; Park 등, 1999; Saari 등, 1999; Shaner 등, 1990). 제초제 저항성 잡초란 제초제를 잡초 군락 내에 정상적으로 살포하였으나 잡초가 생존하여 종자를 맺음으로서 후대까지도 이러한 능력이 유전되어지는 것을 말한다. 이러한 제초제 저항성 잡초들은 2003년 현재까지 전세계적으로 171 초종, 284 계통이 약 270,000 필지에서 발생되었다고 보고되었다(Heap 등, 2003). 또한 제초제 계통별 저항성 잡초 발생경향은 1990년대 초

까지는 triazine계 제초제에 대한 저항성 초종이 주로 많이 보고되어 졌으나 1990년대 이후부터는 식물체의 분지 아미노산 생합성에 촉매 역할을 하는 acetolactate synthase(ALS)를 저해하는 SU계 제초제들에 대한 저항성 잡초들이 급격하게 증가하고 있다(Saari 등, 1992; Uchino 등, 2003). SU계 제초제들은 하나의 특정한 작용점에서 활성을 나타내고, 그 작용점은 보통 하나의 유전자 혹은 극소수의 유전자에 의해서 지배를 받기 때문에 반복해서 처리할 경우 작용점의 변형으로 잡초가 저항성으로 발현하게 될 가능성이 매우 높다(Ballard 등, 1995). 저항성 잡초는 제초제에 대한 반응이 변화된 상태라고 할 수 있기 때문에 SU계 제초제들에 대한 저항성 잡초들 역시 포장에 일단 발생하면 이들 제초제들로는 더 이상 방제가 불가능할 정도로 높은 생물적 저항성이 나타났다. 이러한 SU계 제초제들에 대한 잡초 생태형간 생물적 반응 차이의 원인은 작용점인 ALS 활성 반응 차이 때문이다(Coupland 등, 1990; Lovell 등, 1996). 감수성 생태형의 ALS 활성은 저항성 생태형 보다 훨씬 민감하게 반응하는 것으로 나타내는데, 이러한 ALS 활성 반응 차이의 원인 즉 저항성 발현 메카니즘은 저항성

\*연락처

계통 ALS 유전자의 돌연변이와 저항성 계통의 제초제 흡수 이행 및 대사 차이의 두 가지 가능성에 대하여 연구되어 지고 있다(Guttieri 등, 1992; Usphall 등, 1986). 최근에 SU계 제초제에 대한 몇몇 잡초들의 저항성 생태형의  $^{14}\text{C}$  화합물의 흡수, 이행율이 감수성 생태형과 차이가 없는 것으로 보고되었고(Manley 등, 1999; Paul 등, 1995; Yuyama 등, 1987), 미국과 유럽의 밀밭에서 연용되고 있는 chlorsulfuron에 대한 땀싸리(*Kochia scoparia* L.)와 가시상치(*Lactuca serriola* L.)의 저항성 생태형은 아미노산 서열에서 nucleotide 상동성이 상대적으로 낮은 부위인 Domain A 부위에 있는 ALS 유전자의 점 돌연변이 때문이라고 보고되었다(Paul 등, 1995). 그러나 이들 초종에 대한 저항성 생태형의 생물적 및 생화학적 반응, ALS 유전 염기서열이 채집된 지역에 따라서 서로 상이 하였을 뿐만 아니라 같은 SU계 저항성 잡초인 *Salsola iberica*의 저항성 생태형은 ALS 유전자에서 어떠한 돌연변이도 발생되지 않았다고 보고되어지는 등 현재까지 SU계 제초제에 대한 저항성 잡초의 작용기작은 명백히 밝혀지지 않고 있는 실정이다(Guttieri 등, 1995). 따라서 본 연구는 우리나라 논에서 SU계 제초제에 대한 저항성 잡초로 가장 먼저 확인되어 확산되고 있는 물옥잠을 대상으로 저항성 정도를 조사한 다음 저항성 작용기작을 구명하기 위하여 생태형간 ALS 활성반응,  $^{14}\text{C}$ bensulfuron의 체내 흡수이행, 그리고 ALS 유전자의 염기서열 분석을 하였다.

## 재료 및 방법

### 생태형별 채집지역

이 실험에 사용된 물옥잠의 저항성 생태형은 다년간 SU계 혼합 제초제 사용으로 물옥잠이 우점화된

충남 서산 간척지 논에서 종자를 채종하였으며, 감수성 생태형은 제초제 접촉이 전혀 없었을 것으로 추측되는 경기도 수원시 저수지에서 채종된 것을 사용하였다.

### SU계 제초제에 대한 생태형간 생물적 반응

국내 논에서 널리 사용 중인 azimsulfuron, bensulfuron, cinosulfuron, ethoxysulfuron, imazosulfuron 그리고 pyrazosulfuron 입제를 물옥잠 2~3 엽기에 처리하였다. 처리 약량은 표 1과 같이 약종별 국내 논에서 사용 중인 표준량 대비 0.02, 0.04, 0.2, 1, 5 그리고 10 배량을 입제로 처리하여 3반복으로 완전임의 배치하였다. 물옥잠 생태형별 생존율 및 생체중은 처리 후 20일에 조사하였으며, 생체중 50%를 억제하는 제초제 농도인  $\text{GR}_{50}$ 값을 계산하였다.

### ALS 活性 反應

식물생육상(Conviron's E-15, Canada) 내에서 4~5엽기까지 생육된 물옥잠 지상부를 수확한 후 즉시 액체질소에 동결하여 사용하였다. 액체질소에 동결된 물옥잠 50 g을 Ray(1984)방법에 의하여 1 mM sodium pyruvate, 0.5 mM thiamine pyrophosphate(TPP), 10  $\mu\text{M}$  flavine adenine dinucleotide(FAD), 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 와 10% glycerol이 용해된 0.1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH7.5)의 완충용액 150 mL에 넣고 homogenizer(SMT-PA)로 마쇄한 다음 8점의 cheesecloth로 여과한 액을 27,000g에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 이용하였다. 효소활성은 Westerfield(1945)의 방법에 따라 생성된 acetoin의 양을 측정하였으며, 효소활성은 acetoin에 대한 표준곡선을 이용하였으며, 단위 시간 당 생성되는 단백질에 대한 acetoin 양으로 표시하였다. ALS 활성 50%를 억제하는 제초제 농도인  $\text{I}_{50}$ 를 계산하였다.

Table 1. Dose of sulfonylurea herbicides used in this experiment

Herbicide	Dosage(g a.i. ha <sup>-1</sup> )					
Azimsulfuron GR <sup>a)</sup>	0.3	0.6	3	15	75	150
Bensulfuron GR	1.02	2.04	10.2	51	225	510
Cinosulfuron GR	0.42	0.84	4.2	21	105	210
Ethoxysulfuron GR	0.42	0.84	4.2	21	105	210
Imazosulfuron GR	1.5	3	15	75	375	750
Pyrazosulfuron GR	0.42	0.84	4.2	21	105	210

<sup>a)</sup>Granule

### [<sup>14</sup>C]Bensulfuron 흡수이행 및 autoradiography

#### ○ 흡수이행 조사

물옥잠 생태형간 [<sup>14</sup>C]bensulfuron의 흡수이행 정도를 알아보기 위하여 25±5°C 유리 온실에서 생육된 6~7엽기의 물옥잠을 사용하였다. 균일하고 건전한 식물체를 흐르는 물에 세척 후 방사능이 약 50,000 dpm/mL가 되도록 희석된 수도용 배양액에 생태형별로 각각 15주씩 1, 3, 6, 12 및 24시간 동안 근부를 침지 흡수시킨 다음 흐르는 물에 다시 세척하여 근부와 경엽부를 분리 채취하였다. 분리 채취된 식물체는 진공상태의 동결건조기(일신 BONDIRO)에 완전히 건조시킨 다음 뿌리와 줄기 무게를 각각 평량하여 미세하게 마쇄된 시료를 일정량씩 분취하여 표 2와 같은 조건에서 sample oxidizer(Packard model 307)로 연소시켜 cocktail buffer에 포집된 방사선 동위원소를 liquid scintillation counter(LSC, Packard model 1600TR)로 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

Table 2. Conditions of sample oxidizer conditions for combusting the two biotypes of *Monochoria korsakowii* grown in rice culture solution containing [<sup>14</sup>C]bensulfuron.

Sample size	0.3 g
Pressure	N <sub>2</sub> : 34 psig at initial 50 psig O <sub>2</sub> : 45 psig at initial 50 psig
Combustion time	45 sec
Cocktail volume	CARBO-SORB 8 mL FERMAFLOUR v 8 mL

#### ○ Autoradiography

Autoradiography는 [<sup>14</sup>C]bensulfuron를 수도용 배양액에서 흡수이행 시킨 후 식물체를 식물표본 제작 용압착기로 고정하여 60°C 항온기 내에서 7일간 건조시켰다. 건조시킨 식물체는 X-ray film(Biomax<sup>TM</sup> MS Scientific imaging film, 8×10 inch, Kodak)에 7일간 노출시킨 후 Fuji film processor(FPM 1200, Kodak)로 현상하였다.

#### ALS 유전자 염기 및 아미노산 서열 분석

ALS 유전자의 염기서열을 위한 DNA는 cetyltrimethyl ammonium bromide(CTAB)를 사용하여 유리 온실에서 생육된 6~7 엽기의 감수성 및 저항성 생태형

물옥잠으로부터 분리하였다. 물옥잠의 ALS 유전자에 대한 primer의 설계는 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 유전자은행 (GenBank)에 등록된 ALS 유전자 염기서열을 이용하였다. Degenerate 및 generate primer는 유전자 은행에 등록된 12개의 ALS 유전자 염기서열을 multiple alignment한 다음 공통 염기서열을 탐색하여 primer를 합성하였다. ALS 유전자의 cDNA 합성은 물옥잠으로부터 분리한 total DNA와 기존에 알려진 다른 잡초 초종들에 대한 ALS 유전자의 공통 염기서열로부터 설계한 primer를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 실시하였다. PCR로 증폭한 cDNA는 direct sequencing에 사용하기 위하여 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN Co.)를 이용하여 정제하였다. 정제한 cycle sequencing product는 denaturing시킨 다음 얼음에 냉각시켜 ABI Prism 310에 loading 하였다. 전기영동은 50°C 15 kV, Laser power 10m서 실행하였으며 sequence는 ABI 310 automatic sequencer를 사용하여 결정하였다. 염기서열 분석은 DNASTAR package (version 1.02, DNASTAR) 프로그램을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### SU계 제초제에 대한 물옥잠의 저항성 반응

표 3은 물옥잠 생태형간 생체중을 50% 억제하는 제초제 농도인 GR<sub>50</sub>값을 나타낸 것이다. 저항성 생태형 물옥잠에 처리한 모든 제초제들의 GR<sub>50</sub>값은 감수성 생태형 보다 훨씬 높게 나타났다.

저항성 생태형에 대한 bensulfuron, cinosulfuron 그리고 pyrazosulfuron의 GR<sub>50</sub>값은 감수성 생태형 보다 각각 40.3배, 41.6배 그리고 63.5배 높게 나타났으나 azimsulfuron과 ethoxysulfuron에서는 각각 8.6배 및 4.6배 정도 높게 나타나 다른 제초제들에 비해 상대적으로 낮았다.

따라서 SU계 제초제가 연용되어 우점화된 물옥잠은 조사된 모든 제초제들에 저항성이 발현되는 교차저항성이 있었으며, 반응 정도는 제초제들 간에 서로 다르게 나타났다.

또한 SU계 제초제들 종류에 따라 저항성 정도가 다른 것은 SU계 제초제 구조식 중 약효 활성에 관련되는 aryl 그룹이 서로 다르기 때문이다(Wang 등, 1997).

Table 3. GR<sub>50</sub> value of sulfonylurea herbicides on resistant(R) and susceptible(S) *Mnochoria korsakowii* in greenhouse

Herbicide	GR <sub>50</sub> (g a.i.ha <sup>-1</sup> )		Ratio(R/S)
	R	S	
Azimsulfuron	107.1	12.5	8.6
Bensulfuron	273.2	1.2	40.3
Cinosulfuron	20.8	40.5	41.6
Ethoxysulfuron	19.7	4.3	4.6
Imazosulfuron	69.0	1.9	36.3
Pyrazosulfuron	25.4	0.4	63.5

## ALS 活性 反應

표 4는 물옥잠 생태형간 ALS 활성을 측정 후 생태형간 I<sub>50</sub>을 나타낸 것으로서 저항성 생태형의 I<sub>50</sub> 값은 감수성 생태형 보다 bensulfuron, imazosulfuron 그리고 pyrazosulfuron이 각각 76배, 66배 그리고 62배 높게 나타났으며, azimsulfuron과 ethoxysulfuron은 각각 14배 및 27배 높게 나타났다. 따라서 SU계 제초제들에 대한 잡초의 생태형간 생물적 반응 차이는 이들 제초제들의 작용점인 ALS의 활성반응 차이 때문이라고 생각되어 진다.

Table 4. Concentration of sulfonylurea herbicides required to inhibition 50% of ALS activity(I<sub>50</sub>) isolated from sulfonylurea - resistant (R) and -susceptible (S) *Monochoria korsakowii*

Herbicide	I <sub>50</sub> (nM)		Ratio(R/S)
	R	S	
Azimsulfuron	1021	72	14
Bensulfuron	529	7	76
Cinosulfuron	152	4	38
Ethoxysulfuron	882	39	27
Imazosulfuron	528	8	66
Pyrazosulfuron	372	6	62

[<sup>14</sup>C]bensulfuron 흡수이행 및 autoradiography

## ○ 흡수이행 조사

SU계 제초제에 대한 물옥잠 생태형간 생물활성 차이는 이들 제초제에 대한 생태형간 ALS 활성 차이가 비롯되었음을 알 수 있었다. 그러나 이러한 ALS의 반응차이를 나타내게 하는 원인을 약제의 흡수이행으로 구명하기 위하여 6~7 엽기의 식물체에 [<sup>14</sup>C]bensulfuron를 처리하여 경과 시간별 물옥잠 생태형간 흡수

율 및 이행을 조사하였다(그림 1). 뿌리에 의한 생태형간 [<sup>14</sup>C]bensulfuron의 흡수율은 처리 후 시간이 경과할 수록 증가하였으나 생태형간 일정한 차이는 없었다. 처리 후 6시간까지는 감수성 생태형의 흡수율이 다소 많았으나 12시간 이후부터는 오히려 저항성 생태형이 다소 높게 나타났고, 24시간 경과 후에는 생태형간 거의 차이가 없었다. 전체적으로 볼 때 식물체 뿌리에 의한 [<sup>14</sup>C]bensulfuron의 흡수율은 생태형간 뚜렷한 차이가 없었다.

일반적으로 식물체에 있어서 <sup>14</sup>C 화합물의 흡수율의 차이는 뿌리에서 경엽부로 이행되는 이행율의 차이에 근거하기 때문에, 뿌리에 의하여 흡수되어진 [<sup>14</sup>C]bensulfuron 중에서 경엽부로 이동된 비율은 생태형간 뚜렷한 차이가 없었다. 생태형간 이행율은 처리 후 시간이 경과할 수록 높게 나타났으며, 처리 후 3시간까지는 감수성 생태형의 이행율이 다소 높게 나타났으나 그 이후부터 12시간까지는 저항성 생태형이 다소 높았고, 24시간 후에는 감수성 생태형이 조금 높게 나타나 생태형간 뚜렷한 차이를 구별할 수 없었다.

## ○ Autoradiography

위와 같은 물옥잠 생태형간 [<sup>14</sup>C]bensulfuron의 흡수 및 이행 양상은 그림 2와 같이 처리 후 경과 시간별 X-ray film으로 현상한 autoradiograph로 확인할 수가 있다. 두 생태형 모두 뿌리 침지 1 시간 후에는 주로 근부에서만 흡수되었다. 3시간 이후부터 경엽 부위가 어느 정도 나타나기 시작하여 12 시간 후에는 근부와 경엽부에서 뚜렷하게 나타나 24 시간 경과 후에는 경엽부로 이행량이 증가되고 있음을 볼 수 있었으나 생태형간 뚜렷한 차이는 구별할 수가 없었다. 따라서 물옥잠 생태형간 ALS 활성 차이의 원인은 SU

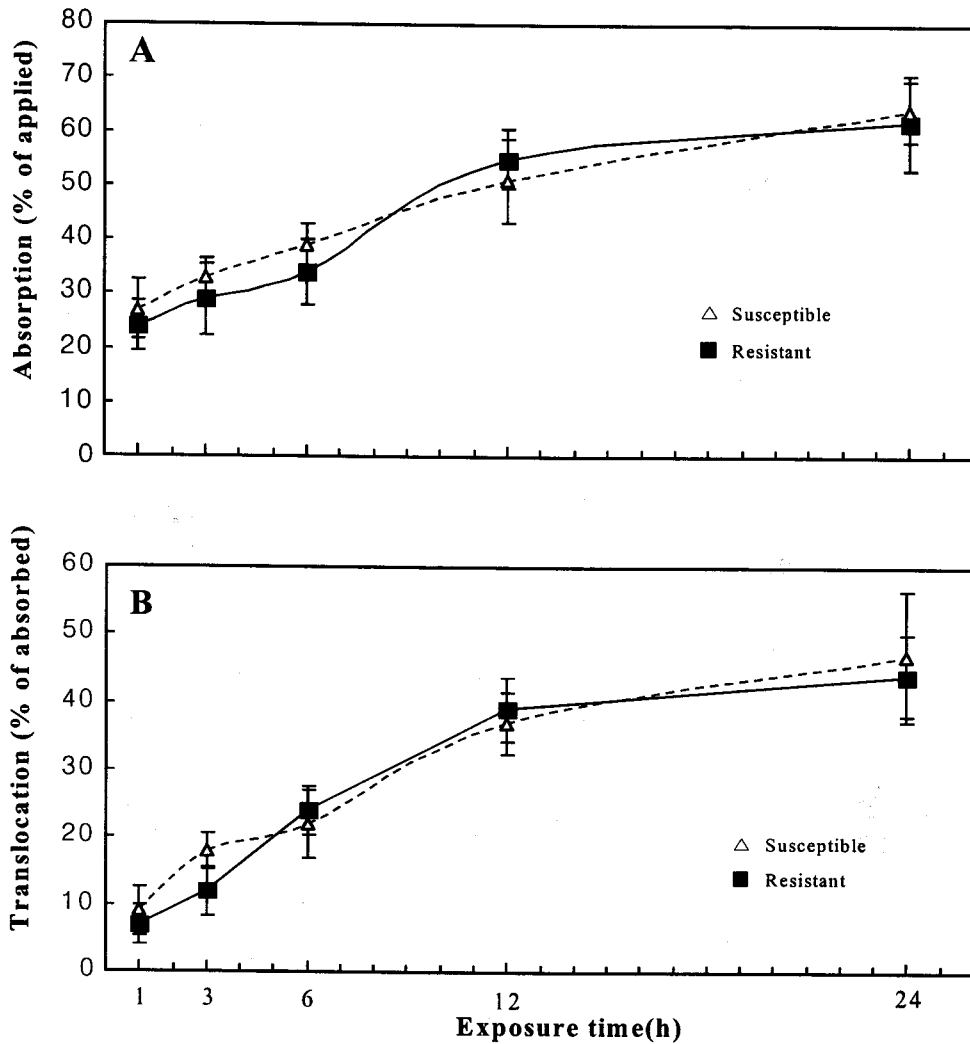


Fig. 1. Time sequenced absorption (A) and translocation (B) of [<sup>14</sup>C]bensulfuron by sulfonyleurea-susceptible and -resistant *Monochoria korsakowii* grown in rice culture solution containing 50,000 dpm/mL of [<sup>14</sup>C]bensulfuron.

계 제초제의 흡수이행 차이 때문이 아닌 것으로 생각된다.

#### ALS 유전자 염기 및 아미노산 서열 분석

물옥잠 생태형간 ALS 유전자 영역을 포함하는 cDNA의 염기서열을 분석한 결과 그림 3과 같이 ALS 유전자 중간 영역에 염기서열을 확인할 수가 있었다. 저항성 생태형의 ALS 유전자 감수성 생태형과 다른 3개의 아미노산 서열이 존재하였는데, 168번째 threonine이 serine으로, 189번째 histidine이 arginine로, 그리고 247번째 phenylalanine이 aspartic acid으로 변이되었기 때문에 저항성을 나타내는 단백질 구조의 변형에 결정적 역할을 했을 가능성이 높다. 즉 저항성

생태형의 ALS 유전자의 3개 부위에서 각각 하나의 염기 치환에 의한 돌연변이는 아미노산 1차 구조를 결정하는 반복적 뉴클레오티드가 제초제에 의한 선택압에 누적적으로 변이하여 나타난 결과로 생각된다. 특히 189번째 histidine이 arginine으로 변이는 histidine이 단백질 구조의 휨을 결정하는 주요 아미노산이기 때문에 주목할 만 하다 그러나 기존에 SU계 제초제에 의하여 체세포 배양된 저항성 생태형과는 달리 Domain A(음영부분)에서는 어떠한 돌연변이도 발생치 않았는데 이는 체세포 배양 및 형질전환으로 유도된 저항성 식물들은 제초제 한가지 농도에 의한 계속적인 선택압으로 아미노산 서열에서 nucleotide 상동성이 상대적으로 낮은 부위인 Domain A 부위에 있는 ALS 유전자의 점 돌연변이가

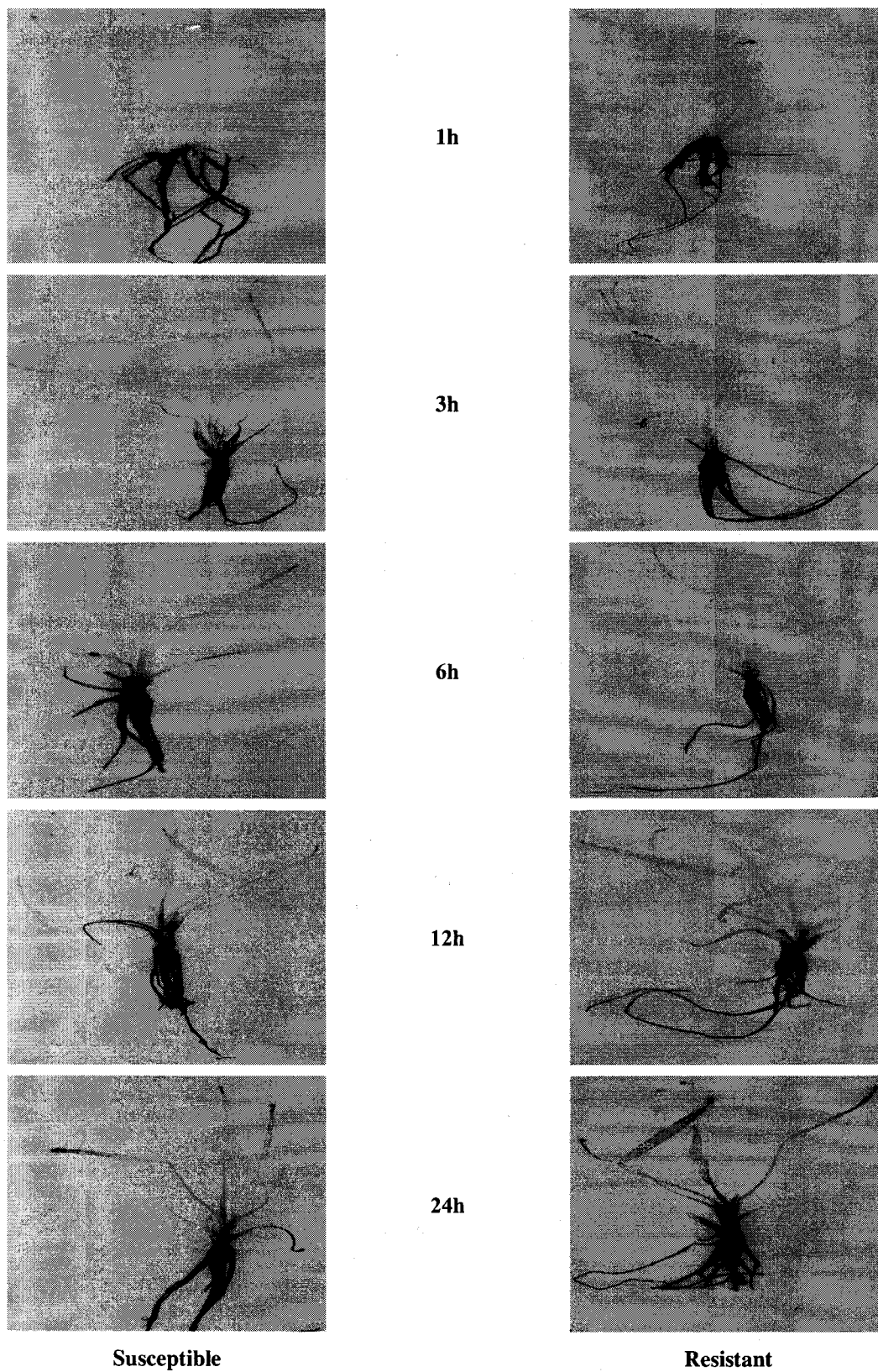


Fig. 2. Autoradiograms showing absorption and translocation of [<sup>14</sup>C]bensulfuron in sulfonylurea -susceptible and -resistant *Monochoria korsakowii*. Plants were allowed to absorb [<sup>14</sup>C]bensulfuron in culture solution for growing rice.

Amino acid sequence of ALS gene in susceptible biotype  
 Nucleotide sequence of ALS gene in susceptible biotype  
 Nucleotide sequence of ALS gene in resistant biotype(PTS)  
 Amino acid sequence of ALS gene in resistant biotype(PTS)

41	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Ile	Pro	Met
121	CCC	GGA	GCT	ACC	AAC	CTC	GTC	TCT	GCC	CTG	GCT	GAC	GCC	CTC	CTC	GAT	TCT	ATA	CCC	ATG
121	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
41	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
61	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu	Thr
181	GTC	GCY	ATC	ACC	GGC	CAG	GTC	CCT	CGC	CGC	ATG	ATC	GGY	ACT	GAC	GCC	TTC	CAR	GAG	ACG
181	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
61	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
81	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Val	Asp
241	CCC	ATC	GTC	GAG	GTC	ACG	CGC	TCC	ATC	ACC	AAG	CAC	AAC	TAC	CTT	GTC	CTC	GAC	GTC	GAT
241	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
81	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
101	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Ile	Lys	Glu	Ala	Phe	Phe	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro
301	GAC	ATT	CCC	AGG	ATA	ATA	AAG	GAG	GCA	TTT	TTC	ATC	GCC	ACC	AGT	GGC	CGT	CCC	GGT	CCA
301	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
101	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
121	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Ala	Val	Pro	Val	Trp	Asp	Pro
361	GTA	CTC	GTG	GAC	ATC	CCA	AAG	GAC	ATC	CAA	CAG	CAG	CTC	GCG	GTG	CCW	GTC	TGG	GAT	CCR
361	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
121	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
141	Pro	Val	Arg	Leu	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Leu	Pro	Lys	Pro	Pro	Ala	Leu	His	Leu	Leu
421	CCA	GTT	CGC	TTG	CCT	GGT	TAT	GTC	TCC	CGC	CTC	CCC	AAG	CCG	CCY	GCS	CTC	CAT	CTG	CTT
421	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
141	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
161	Gln	Gln	Ile	Ile	Arg <sup>Phe/Leu/Ile</sup>	Val	Thr	Glu	Ser	Ser	Arg	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Gly
481	CAA	CAA	ATT	ATC	CGS	WTM	GTG	ACW	GAG	TCA	AGC	CGC	CCT	GTT	CTC	TAT	GTT	GGT	GGC	GGC
481	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
161	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
181	Cys	Leu	His	Ala	Ser	Glu	Glu	Leu	His <sup>Arg/Cys</sup>	Phe	Ala	Asp	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Ile	Ala	
541	TGT	CTG	CAT	GCM	AGT	GAG	GAG	CTT	CAT	YGT	TTT	GCT	GAC	CTC	ACC	GGA	ATT	CCY	ATW	GCK
541	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
181	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
201	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Val	Tyr	Pro	Leu	Asp	Gly	His	Leu	Ser	Leu	Lys	Met	Leu
601	AGT	ACA	CTG	ATG	GGT	CTT	GGT	GTT	TAC	CCT	CTG	GAT	GGC	CAT	CTC	TCT	TTG	AAG	ATG	TTG
601	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
201	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
221	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ile	Asp	Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala
661	GGC	ATG	CAT	GGT	ACA	GTT	TAT	GCC	AAT	TAT	GCT	ATC	GAT	AAA	GCT	GAC	CTG	TTG	CTA	GCT
661	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
221	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
241	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala
721	TTT	GGG	GTG	AGA	TTY	GAT	GAT	CGA	GTG	ACA	GGG	AAG	CTT	GAG	GCT	TTT	GCA	AGC	CGC	GCA
721	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
241	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
261	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val
781	AAG	ATC	GTG	CAC	ATC	GAT	ATT	GAC	CCA	GCA	GAA	ATT	GGG	AAG	AAC	AAG	CAG	CCT	CAT	GTG
781	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
261	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Fig. 3. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of partial ALS gene of sulfonylurea-susceptible and - resistant *Monochoria korsakowii*. The nucleotide sequence of the susceptible type is shown on the top line, and the sequence of the resistant type is shown on the bottom line. The deduced amino acid sequence of the genes are shown above or below their respective nucleotide sequences. Nucleotides that are common to both biotypes are depicted with dots(.); identical amino acid residues are shown with asterisks(\*). Ambiguous nucleotide represented slashes(/) :K=G+T, M=A+C, R=A+G, S=G+C, W=A+T, Y=C+T.

발생되거나 포장에서 자연적으로 발생하는 저항성 생태형은 제초제의 여러 가지 농도 뿐만 아니라 환경 등 복합적인 선택압에 의하여 ALS 유전자의 다른 부위에서 돌연변이가 발생된 것으로 추측된다.

### 인용문헌

- Adkins, S. W., D. Wills, M. Boersma, S. R. Walker, G. Robinson, R. J. McLeod, and J. P. Einam (1997) Weeds resistant to chlorsulfuron and atrazine from the north-east grain region of Australia. *Weed Res.* 37:343~349.
- Ballard, T. O., M. E. Foley, and T. T. Bauman (1995) Absorption, translocation, and metabolism of imazethapyr in common ragweed (*Ambrosia-artemisiifolia*) and giant ragweed (*Ambrosia trifida*). *Weed Sci.* 43:572~577.
- Boutsalis, P., J. Karotam, and S. B. Powles (1999) Molecular basis of resistance to ALS e-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. *Pesticide Sci.* 55:507~516.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248~254.
- Coupland, D., P. J. W. Lutman, and C. Heath (1990) Uptake, translocation, and metabolism of mecoprop in a sensitive and a resistant biotype of *Stellaria* 29.
- Gaeddert, J. W., D. E. Peterson, and M. J. Horak (1997) Control and cross-resistance of an acetolactate synthase inhibitor-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) biotype. *Weed Tech.* 11:132~137.
- Guttieri, M. J., C. V. Eberlein, C. A. Mallory Smith, D. C. Thill, and D. L. Hoffman (1992) DNA sequence variation in domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and -susceptible weed biotypes. *Weed Sci.* 40:670~676.
- Guttieri, M. J., C. V. Eberlein, and D. C. Thill (1995) Diverse mutations in the acetolactate synthase gene confer chlorsulfuron resistance in *Kochia* (*Kochia scoparia*) biotypes. *Weed Sci.* 43:175~178.
- Heap, I. (1997) The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pestic. Sci.* 51:235~243.
- Heap, I. (2003) International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [http://www. weedscience.org/in.asp](http://www.weedscience.org/in.asp)
- Itoh, K. (2000) Relationship between breeding system and gene dispersal of sulfonyleurea resistant paddy weeds. In 3rd International Weed Science Congress held at Foz Do Iguassu, Brazil. pp.144~145.
- Kohara, H., K. Konno and M. Takekawa (1999) Occurrence of sulfonyleurea-resistant biotypes of *Scripus juncoides* Roxb. var. *ohwianus* T. Koyama in paddy fields of Hokkaido prefecture, Japan. *J. Weed Sci. & Tech.* 44(3):228~235.
- Lovell, S. T., L. M. Wax, D. M. Simpson, and M. McGlamery (1996) Using the *in vivo* acetolactate synthase (ALS) assay for identifying herbicide-resistant weeds. *Weed Tech.* 10:936~942.
- Manley, B. S., K. Hatzios, and H. Wilson P. (1999) Absorption, translocation, and metabolism of chlorimuron and imidazolinone-resistant and -susceptible smooth pigweed (*Amarantus hushybridus*). *Weed Tech.* 13:359~764.
- Park, T. S., C. S. Kim, J. P. Park, Y. K. Oh, and K. U. Kim (1999) Resistant biotype of *Monochoria korsakowii* against sulfonyleurea herbicides in the reclaimed paddy fields in Korea. Proc. 17th APWSS Conf. pp. 251~254, Bangkok.
- Paul B., R. W. Alison, A. R. Barbara, V. S. Mani, and L. S. Daniel (1995) A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *Biological; chemi.* 270:17381~17385.
- Prather, T. S., J. M. Ditomaso and J. S. Holt (2000) Herbicide resistance : Definition and management strategies. <http://anrcatatalog.udavis.edu>.
- Ray, R. B. (1984) Site of action of chlorsulfuron. *Plant Physiol.* 75:827~831.
- Saari, L. L., J. C. Cotterman, and M. M. Primiani (1990) Mechanism of sulfonyleurea herbicide resistance in the broadleaf weed, *Kochia scoparia*. *Plant Physiol.* 93:55~61.
- Saari, L. L., J. C. Cotterman, W. F. Smith, and M. M. Primiani (1992) Sulfonyleurea herbicide resistance in



- common chickweed, perennial ryegrass, and Russian thistle. *Pesticide Biochemi. and Physiol.* 42:110~118.
- Shaner, D. L. and R. G. Lym (1991) Mechanisms of resistance to acetolactate synthase /acetohydroxyacid synthase inhibitors. *Proceedings of the Western Society of Weed Science*, Seattle, Washington, USA, 12~14 March 1991. 44: 122~125.
- Uchino, Guang-Xi Wang, and K. Itoh (2000) Sulfonylurea resistant biotypes of *Lindernia* species in the Tohoku region and their response to several herbicides. *Weed Res.(Japan)* 45(1):13~20.
- Upshall, A., T. Gilbert, G. Saari, P. J. O'Hara, P. Weglenski, B. Berse, K. Miller, and W. E. Timberlake (1986) Molecular analysis of the *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet.* 204:349~354.
- Wang, G. X., H. Kohara and K. Itoh (1997) Sulfonylurea resistance in a biotype of *Monochoria korsakowii*, an annual paddy weed in Japan. *Brighton Crop Protection Conference-Weeds* 1:311~318.
- Westerfield, W. W. (1945) A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.* 161:495~502.
- Yuyama T., S. Takeda, and R. C. Ackerson (1987) Uptake and distribution of bensulfuron-methyl(DPX-F5384) in paddy rice. *Proc. 11th Asian-Pac. Weed Sci. Soc.* 145~151.
- 박태선, 권오도, 김창석, 박재읍, 김길웅 (1999) 한국 수도답에서 sulfonylurea 제초제에 대한 저항성 물달 개비 출현. *한국잡초학회지* 19(2):71~73.
- 박태선, 권오도, 이도진, 변종영 (2001) Sulfonylurea계 제초제 저항성잡초 연구 현황과 전망. *한국잡초학회지* 21(2):99~109.

---

#### Mechanism of Sulfonylurea Herbicide Resistance in Broadleaf Weed, *Monochoria korsakowii*

Tae-Seon Park<sup>\*</sup>, Yang-Bin Lhm, Kee-Sung Kyung, Su-Heon Lee, Jae-Eup Park, <sup>1</sup>Tae-Wan Kim and <sup>2</sup>Kil-Ung Kim (*Department of Crop Protection, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea, <sup>1</sup>Department of Plant Resources Science Hankyong National University, and <sup>2</sup>Dept. of Agronomy, College of Agriculture, Kyungpook National University*)

**Abstract :** This experiment was carried out to study the resistant mechanism of sulfonylurea(SU) herbicides to *Monochoria korsakowii* occurring in the rice fields of Korea. The activity of acetolactate synthase(ALS), absorption and translocation of [<sup>14</sup>C]bensulfuron-methyl, and DNA sequence of ALS genes were studied. The apparent SU resistance to *Monochoria korsakowii* was confirmed in greenhouse tests. Fresh weight accumulation(GR<sub>50</sub>) in the resistant biotype was about 5- to 64-fold higher in the presence of six SU herbicides compared to the susceptible biotype. The ALS activity isolated from the resistant biotype to herbicides tested was less sensitive than that of susceptible biotype. The concentration of herbicide required for 50% inhibition of ALS activity(I<sub>50</sub>) was 14- to 76-fold higher as compared to the susceptible biotype. No differences were observed in the rates of [<sup>14</sup>C]bensulfuron uptake and translocation. However, the DNA sequence from the resistant biotype differed from that of the susceptible biotype by single nucleotide substitution at three amino acid each in the middle region excluding the ends of ALS genes. We found three point mutations causing substitution of serine for threonine at amino acid 168, arginine for histidine at amino acid 189, and a aspartic acid for phenylalanine at amino acid 247, respectively, in the resistant biotype.

---

\*Corresponding author (Fax : +82-31-290-0409, E-mail : jlpark@rda.go.kr)