

## 담배(*Nicotiana tabacum*) 細胞培養에 의한 Glyphosate - 抵抗性 個體의 再分化

崔相烽·李光雄

(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

### Regeneration of Glyphosate-Resistant Plant from Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Cell Culture

Choi, Sang Bong and Kwang-Woong Lee

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

#### ABSTRACT

From the single cell cultures of haploid tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. NC 2326) glyphosate-resistant plants were regenerated. After treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and then inoculated onto the LS medium supplemented with 1 mM glyphosate, the single cells survived formed colonies and calluses in 65 and 95 days after culture, respectively, and then whole plants were regenerated in 0.1 mM glyphosate-containing medium from the selected calluses. There was no difference in fresh weight and shikimate content between the selected and normal haploid calluses. When sprayed with 0.1 mM glyphosate, the shikimate contents in the regenerated and normal plants were 0.659 and 20.816 mol/g fr. wt., while that in other normal plants which were not sprayed was 0.921. In addition, the calluses induced from the regenerated plants grew without showing any retardation when treated with glyphosate. These results indicate that the selected calluses and regenerated plants are resistant to glyphosate.

#### 緒 論

Glyphosate는 廣範圍·非選擇性 除草劑이지만(Baird *et al.*, 1971), 土壤殘留가 적고(Sprankle *et al.*, 1975a) 微生物에 의한 分解가 활발하며(Sprankle *et al.*, 1975b; Hance, 1976; Rueppel *et al.*, 1977; Beasley *et al.*, 1979), 細菌과 植物體에만 작용하는(Wyrrill and Brunside, 1976) 특징이 있다. 이 除草劑는 植物과 微生物에서 여러 종류의 代謝活動, 즉, 葉綠體의 구조(Pihakaski and Pihakaski, 1980), thylakoid 膜(Brecke and Duke, 1980), 단백질(Hoagland, 1980) 및 核酸(Foley *et al.*, 1983)의 合成, 光合成(van Rensen, 1974)과 光合成의 電子傳達系(Munoz-Rueda *et al.*, 1986)의 變化를 誘發한다고 보고되어 왔다. 그러나, 지금까지 확실하게 밝혀진 glyphosate의 일차적인 작용은, shikimate pathway의 산물인 芳香族 아미노산 合成의 저해뿐이다(Jaworski, 1972; Hoagland and Duke, 1982). 특히 이 저해과정에서 shikimate가 축적됨이 보고되었고(Amrhein *et al.*, 1980; Berlin and Witte, 1980), 이것은 세포질 내의 EPSP(5-enolpyruvyl shikimate-3-phos-

phate) synthase 阻害에 의한 결과라는 사실이 밝혀졌다(Höllandner and Amrhein, 1980; Steinrücken and Amrhein, 1980). 그런데, 그 후 glyphosate를 처리한 식물체에서 세포질의 DAHP(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate) synthase와 세포질 및 색소체의 EPSP synthase활성이 저해됨이 보고되었다(Rubin *et al.*, 1982, 1984; Ganson and Jensen, 1985; Jensen, 1985). 따라서 glyphosate의 저해작용은 shikimate pathway 내에서 복잡한 양상으로 나타난다는 것을 알 수 있다. 이러한 점에서 glyphosate-저항성 식물체를 誘導함에 있어 특정 遺傳子만을 cloning하여 形質轉換하는 방법은 多少의 문제가 있을 수 있고, 실제로 *Salmonella typhimurium*의 돌연변이 EPSP synthase 유전자를 형질전환하여 얻은 담배 個體는 不安定한 抵抗性を 나타내었다(Comai *et al.*, 1983, 1985).

한편, 細胞培養에서는 除草劑 抵抗性 因子의 發現이 再分化 후에도 다른 有用 因子보다 비교적 잘 되는 것으로 알려져 있고(Chaleff, 1981, 1983; Chaleff and Ray, 1984), 上記한 바와 같은 遺傳子 操作에서 야기되는 문제를 克服할 수 있는 장점이 있다. 또한, 細胞培養을 이용하여 picloram(Chaleff and Parsons, 1978; Chaleff, 1980), chlorosulfuron, sulfometuron methyl(Chaleff and Ray, 1984) 및 amitrole(Singer and McDaniel, 1984) 등에 抵抗性인 담배 個體의 誘導가 이미 보고된 바 있다.

이와 같은 사실에 기초하여 본 연구에서는 半數體 담배 칼루스에서 單細胞를 分離하여 突然變異를 誘發시킨 후 glyphosate가 첨가된 選別培地에서 배양함으로써 glyphosate-저항성 칼루스 및 再分化 個體를 유도하고 더불어 그 安定性を 검정하고자 하였다.

## 材料 및 方法

**材料, 試藥 및 機器.** 栽培種 담배 *Nicotiana tabacum* cv. NC 2326의 半數體(n=24) 잎을 1 mg/l  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid(NAA), 0.1 mg/l kinetin이 포함된 LS배지(Linsmaier and Skoog, 1965)에 배양하여 형성된 칼루스를 이용하였고, isopropylamine 염으로 formulation된 除草劑 glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine]는 Monsanto Inc., Korea, Seoul Branch에서 공급받아 0.45  $\mu$ m 필터로 여과하여 사용하였다. Shikimate는 서울대학교 수의과 대학의 HPLC(Waters, Model 450)를 이용하여 정량하였다.

**Glyphosate 處理濃度 決定.** 0.1에서 2 mM까지의 glyphosate가 첨가된 배지 조건하에서 초기 생체중이 0.5 g 인 칼루스의 13일 후 생체중 증가량을 측정하여 대조구에 비하여 그 증가량이 3.9%로 극히 낮을 때의 농도인 1.0 mM을 칼루스 수준에서의 處理濃度로 결정하였다(Fig. 1). 식물체 수준에서의 處理濃度는 滅菌種子를 0.01  $\mu$ M에서 10 mM까지의 glyphosate가 첨가된 배지에 播種하여 幼植物의 성장을 완전히 抑制시키는 농도인 0.1 mM로 정하였다(Fig. 2f).

**單細胞의 分離·培養 및 選拔 個體의 再分化.** 칼루스를 7일간 懸濁培養한 후 酵素溶液(1.0% macerozyme, 0.5 M sorbitol, 0.1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2.0 mM MES, pH 5.7)으로 2~2.5시간 처리하여 單細胞를 분리하고, 突然變異 誘發物質 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, Fluka AG)이 첨가된 溶液(MNNG 10 mg/l, 0.2 M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 5.7)으로 30분간 處理하여 세척하거나 또는 處理없이 직접 1 mM glyphosate를 포함하는 4% agar배지(1 mg/l NAA, 0.1 mg/l kinetin)에  $5 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 6.5~7.0 ml씩 petridish( $\phi$ 55 mm)에 배양하였다. 살아 남은 콜로니를 選拔하여 동일 조건의 8% agar 배지로 옮겨 暗 상태에서 칼루스를

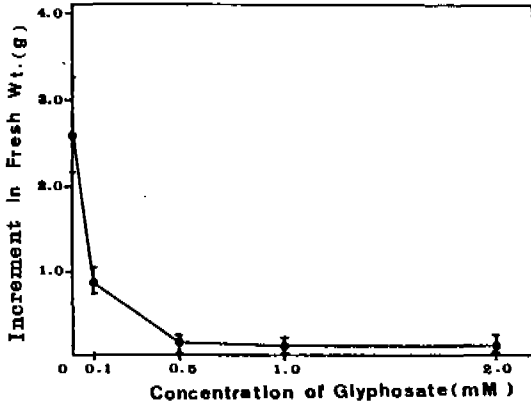


Fig. 1. Effect of glyphosate on tobacco callus growth. The callus was cultured for 13 days and its initial weight was 0.5 g.

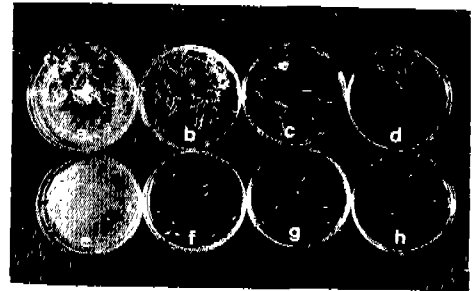


Fig. 2. Effect of glyphosate on the growth of whole plants germinated hormone-free LS medium containing glyphosate at different concentration. a, control; b, 0.01  $\mu$ M; c, 0.1  $\mu$ M; d, 1  $\mu$ M; e, 0.01 mM; f, 0.1 mM; g, 1 mM and h, 0.01 M. The ratio of germination was not significantly different.

誘導하였다. Shoot는 형성된 칼루스를 0.1 mM glyphosate, 0.3 mg/l indole-3-acetic acid(IAA)와 3.0 mg/l 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimethylallylamino)purine이 포함된 배지로 옮겨 분화시켰고, root는 0.1 mM glyphosate, 0.1 mg/l NAA 添加培地에서 유도하였다.

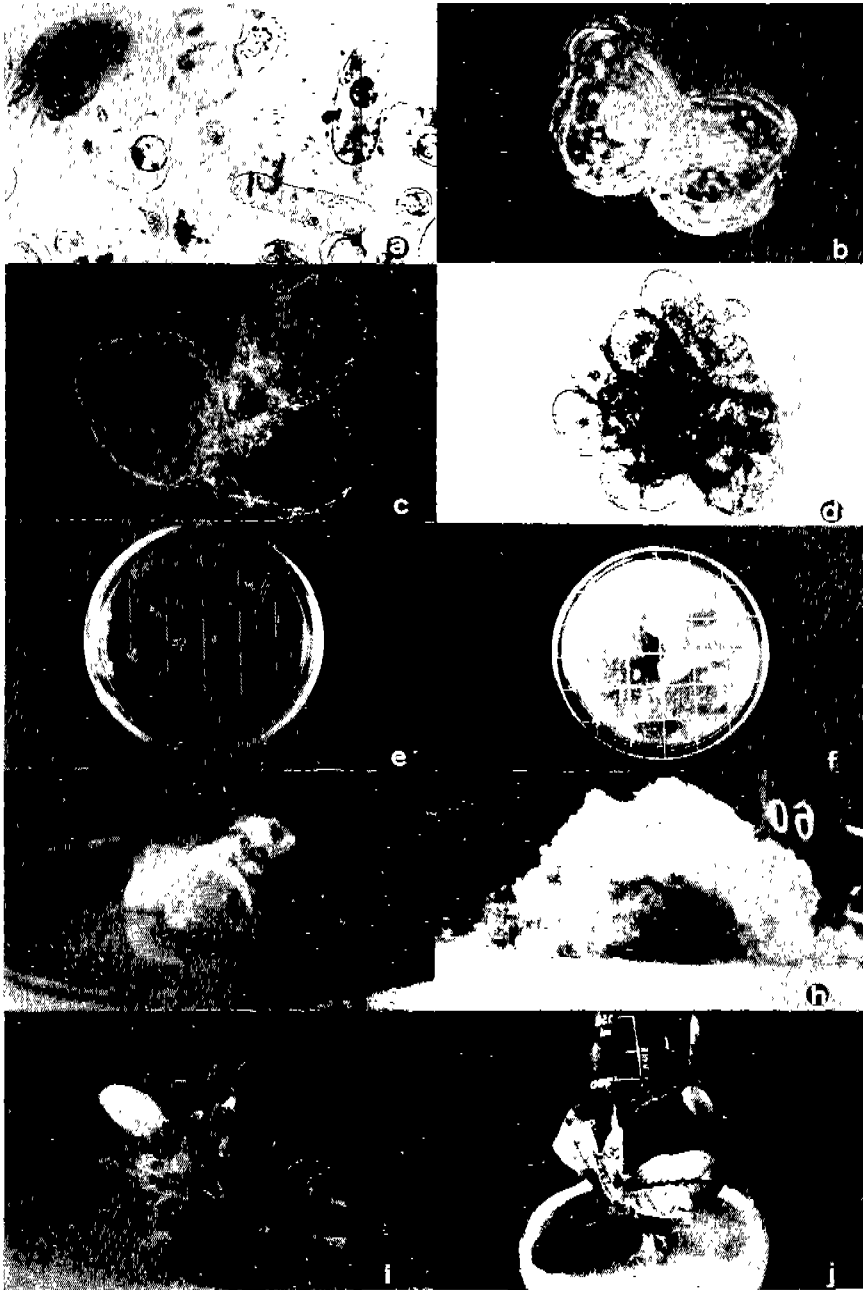
**Shikimate 定量.** 試料로부터 抽出한 溶液을 Gaitonde와 Gordon(1958)의 방법에 따라 정제하였다. Reversed-phase HPLC를 이용한 shikimate의 定量은 quinic acid 및 그 誘導體의 定量을 위하여 사용하였던 Nagels 등(1980)의 방법을 변형하여  $C_{18}$ (250 mm $\times$ 4.6 mm I.D.)로 분당 1 ml의 溶出速度로 253 nm에서 행하였다.

**選抜個體의 安定性.** 再分化된 個體의 잎을 1 mM glyphosate가 添加된 배지에 배양하여 칼루스 형성 여부를 조사함으로써 安定性を 확인하였다.

### 結 果

**칼루스 및 再分化 個體의 誘導.** 突然變異 誘發物質 MNNG 處理 후 單細胞(Fig. 3a)는 1 mM glyphosate가 포함된 배지에서 배양 2일 후부터 分裂하기 시작하여(Fig. 3b) 5일이 지나면서 3~4개의 細胞로 分裂하고(Fig. 3c), 4주 후에는 여러 개의 세포가 뭉쳐 있는 상태로 변화하였다(Fig. 3d). 그리고, 배양 8주 후 직경이 3~4 mm 되는 콜로니가 petridish 당 2~8개씩 나타났으며(Fig. 3e), 이로부터 2주 경과한 콜로니(Fig. 3f)를 동일한 조건의 8% agar 배지로 옮겨 2주 후에 칼루스를 얻을 수 있었다(Fig. 3g). 이들 칼루스는 0.1 mM glyphosate가 포함된 shoot 분화 배지에서 shoot를 형성하기 시작하여(Fig. 3h) 서서히 여러 개의 shoot로 분화하였고(Fig. 3i), 그 후 0.1 mM glyphosate를 포함하는 root 분화 배지에서 뿌리를 형성하여 완전한 식물체로 再分化되었다(Fig. 3j).

**選抜 칼루스 및 個體의 抵抗性.** Glyphosate 添加培地에서 살아 남은 4종류의 칼루스(Gly 1~Gly 4)를 glyphosate-抵抗性 cell line으로 판단·선별하였다. 이들을 1 mM glyphosate가 첨가된 배지에 옮겨 14일 배양한 결과 그 생체중 증가량이 2.00~3.30 g으로, glyphosate가 없는 배



**Fig. 3.** Single cell culture from *Nicotiana tabacum* cv. NC 2326 haploid callus. a, Freshly isolated single cells; b, Cells after 3-day culture; c, Cells after 6-day culture; d, Cell cluster after 28-day culture; e, Cell colonies from 65-day culture on petridish; f, 78-day-old cell colonies; g, 92-day-old callus tissue; h, Shoot formation, 2 weeks after transfer to shoot induction medium; i, Multiple shoot formation, 5 weeks after transfer; j, Root formation, 2 weeks after transfer to root induction medium.

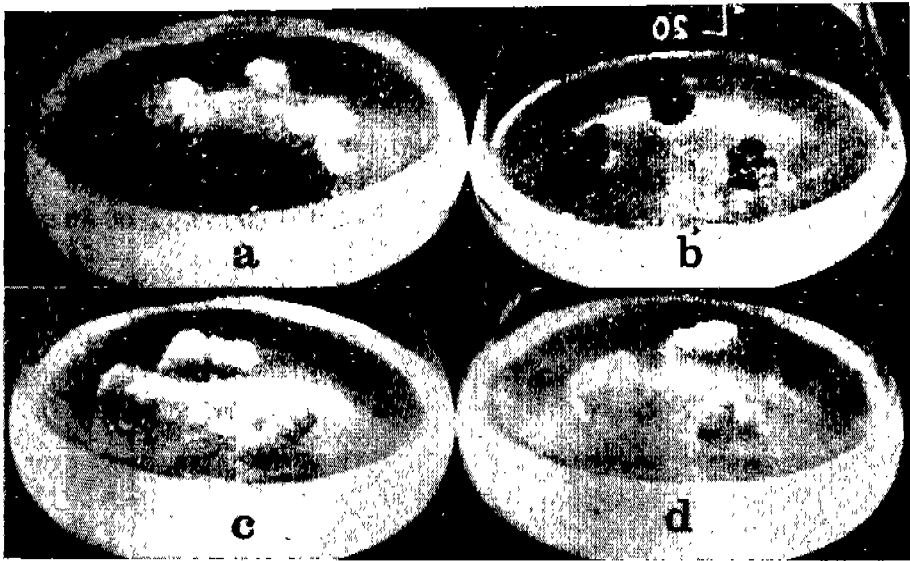
**Table 1.** Comparison of increment in fresh weight between control and cell line obtained after 14-day culture. The initial fresh weight of explant callus was 0.5 g

Cell Line	Concentration of Glyphosate (mM)	$\Delta$ Weight <sup>a</sup> (g · fr. wt.)	% Control
Gly <sup>b</sup> 1	1.0	2.00 ± 0.40	83.57
Gly 2	1.0	3.23 ± 0.23	93.08
Gly 3	1.0	3.30 ± 0.26	95.10
Gly 4	1.0	3.30 ± 0.35	86.45
H <sup>c</sup> 1	0	3.47 ± 0.25	100.00

a; Means are not significantly different at the 1% level by Duncan's multiple range test.

b; Cell lines selected in 1 mM glyphosate-containing medium.

c; Normal haploid callus.



**Fig. 4.** Influence of 1 mM glyphosate on normal (b) and selected callus (d). Glyphosate was not treated to other normal (a) and selected callus (c). Photographed 14 days after transfer.

지에서 배양한 정상 칼루스의 증가량인 3.47 g과 비교하여 5~16%의 비교적 낮은 성장 억제를 보였다(Table 1). 또한 glyphosate가 없는 배지에서 배양한 정상 칼루스를 1 mM glyphosate가 포함된 배지로 옮겼을 경우에는 검게 되면서 枯死하였다(Fig. 4b). 반면 선별 칼루스는 1 mM glyphosate가 포함된 배지에서도(Fig. 4d) glyphosate를 添加하지 않은 배지에서 자란 정상 칼루스(Fig. 4a)와 생장에 차이가 보이지 않았다. 選拔 칼루스는 glyphosate가 없어도 정상적으로 자랐다(Fig. 4c). Shikimate 함량에 있어서는 glyphosate 處理 없이 배양한 정상 칼루스를 1 mM glyphosate 添加培地에서 배양하였을 때에만 51,264 nmol/g · fr. wt.로 다른 칼루스들에서 나타난 1,245~1,673 nmol/g · fr. wt.보다 32~40배 높게 나타났다(Table 2).

選拔 個體의 抵抗性을 확인하기 위하여 대조구 식물체와 選拔 個體에 0.1 mM 의 glyphosate

Table 2. The content of shikimate in callus and plant leaf treated with or without glyphosate

Stage	Cell Line	Conc. of glyphosate (mM)	Content of shikimate <sup>a</sup> (nmol/g fr. wt.)
Callus	H 1 <sup>b</sup> (control)	0	1,459 ± 81
		1.0	51,264 ± 2,640
	Gly <sup>c</sup>	0	1,673 ± 170
		1.0	1,245 ± 66
Leaf	H 1 <sup>d</sup> plant	0	921 ± 7
		0.1	20,816 ± 37
	Gly <sup>c</sup>	0	629 ± 78
		0.1	659 ± 17

a; Shikimate content was determined from callus and plant leaf, each 14 and 2 days after treatment.

Each data represents the mean from 3 experiments.

b; Normal haploid callus.

c; Shikimate content was estimated from the 3 times mean of 4 cell lines (Gly 1~Gly 4).

d; Normal plant which was induced from H1 callus.

를 살포하였을 때 대조구 식물체는 처리 2일 후 시들기 시작하였으나(Fig. 4b) 選拔 個體는 영향을 받지 않았다(Fig. 5a). 또한 잎의 shikimate 함량은 glyphosate 없이 유도한 정상 개체에 서 20,816 nmol/g · fr. wt.로 다른 개체들에서 보여준 629~921 nmol/g · fr. wt.보다 22~30배 높게 나타났다(Table 2).

選拔 個體의 安定性 실험에 있어서 4~5 葉이 出現한 選拔 개체의 잎은 1 mM glyphosate가 첨가된 배지에서 정상적으로 칼루스를 형성하였고(Fig. 6d), glyphosate가 없는 배지에서 같은 결과로 나타나(Fig. 6c) 정상 칼루스(Fig. 6a)와 차이가 없었다. 그러나 정상 개체는 glyphosate를 처리하였을 경우에 칼루스를 형성하지 못하거나 형성하더라도 즉시 枯死하였다(Fig. 6b).

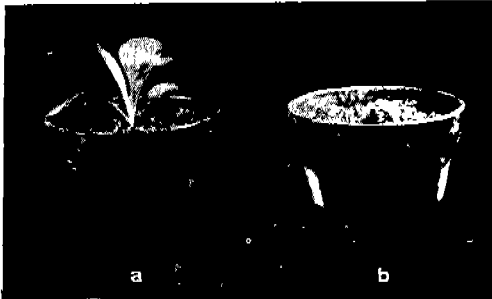


Fig. 5. Plants treated with 0.1 mM glyphosate. a, regenerated tolerant plant; b, control plant.

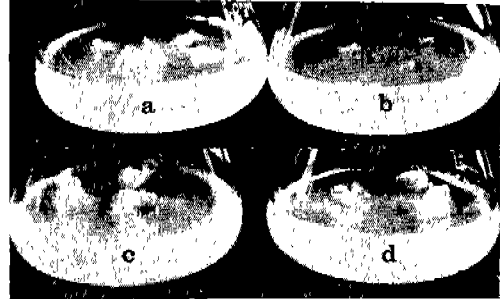


Fig. 6. Calluses induced from control (a and b) and tolerant plant (c and d). a and c, untreated calluses; b and d, 1 mM glyphosate-treated calluses.

## 考 察

Glyphosate-저항성 칼루스와 식물체 選拔을 위하여 培地에 添加된 glyphosate의 濃度는

각각 1 mM, 0.1 mM이었고, 그 이하의 濃度에서도 이들을 치사시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이는 담배 칼루스와 植物體의 완전한 生長抑制가 각각 0.5 mM, 1  $\mu$ M에서 나타났다는 보고(Berlin and Witte, 1980; Singer and McDaniel, 1985)와 비교하여 妥當하다고 볼 수 있다.

選拔된 콜로니로부터 誘導한 4개의 cell line은 glyphosate를 처리하였을 때 생체중 증가량에서 glyphosate를 처리하지 않은 대조구 칼루스와 1% 유의수준에서 차이가 없음이 확인되어, 이들은 glyphosate에 의한 生長抑制가 없는 것으로 판단되었다. 또한, 選拔 칼루스와 대조구 칼루스에 glyphosate를 처리하면 대조구 칼루스는 검게 되며 shikimate가 多量으로 蓄積되지만 選拔 個體에서는 이러한 변화가 나타나지 않는 것으로 미루어 정상적으로 shikimate 內의 酵素가 作用하고 있는 것으로 보였다. 이와 같은 결과는 分化된 식물체에서도 마찬가지로 選拔된 個體는 glyphosate를 처리하여도 정상 개체와 生長의 차이가 없고, shikimate의 蓄積도 없었다.

Glyphosate-抵抗性 당근 칼루스로부터 分化된 個體의 抵抗性 喪失이 보고된 바 있어 (Ashton and Crafts, 1981), 生理的인 變化에 의한 저항성 발현을 고려할 필요가 있으나 (Binns and Meins, 1973; Chaleff, 1981; Chaleff and Keil, 1981), 本 實驗에서 選拔된 칼루스와 個體는 모두 抵抗性을 갖고 있고, 分化個體의 安定性도 확인되어 環境에 의한 변이체일 가능성을 排除하였다. 또한, 器內培養에 의한 耐性 弱화도 4개의 선발 개체 중 3개체는 정상 개체와 외부 형태 및 生育에 차이가 없어 문제되지 않는 것으로 思料되었다. 정상적으로 生長하는 3개체 중 2개체는 돌연변이 유발물질의 처리가 없이 획득된 개체로 glyphosate 처리하에서의 選別壓에 의한 것으로 여겨지며 MNNG 처리를 거쳐 얻은 개체는 核酸의 염기 치환에 의한 저항성 개체일 가능성이 있다(Chaleff and Ray, 1984).

이상의 결과로부터 선발된 개체는 저항성을 나타내는 것으로 판단되었고, 앞으로 이러한 방향의 연구는 저항성 식물의 실질적인 이용을 촉진시킬 수 있을 것으로 思料된다.

## 摘 要

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. NC 2326) 반수체 칼루스의 懸濁培養을 거쳐 分離한 單細胞에 돌연변이 유발 물질을 처리하고 1 mM glyphosate下에서 배양하여 glyphosate-저항성 콜로니와 칼루스를 選拔하였다. 選拔된 칼루스는 0.1 mM glyphosate가 첨가된 배지에서 배양하여 재분화시켰다. 또한 선발된 칼루스와 개체에 glyphosate를 처리하여 이들의 生長速度 및 shikimate 含量을 대조구와 비교하여 生長이 정상적이며 shikimate 함량이 비저항성 칼루스나 식물체보다 32~35배 적음이 관찰되었고, 또 選拔個體도 安定性을 갖고 있음이 확인되었다.

## 參 考 文 獻

- Amrhein, N., B. Deus, P. Gehrke and H.C. Steinrücken. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.* **66**: 830-834.
- Amrhein, N., D. Johanning, J. Schab and A. Schulz. 1983. Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium and plant tissue culture. *FEBS Lett.* **157**: 191-196.
- Ashton, F.M. and A.S. Crafts. 1981. Biochemical response to herbicides. In *Mode of Action of Herbicide*, F.M. Ashton and A.S. Crafts (eds.). John Wiley & Sons, New York. pp. 69-99.
- Baird, D.D., R.P. Upchurch, W.B. Homesley and J. E. Franz. 1971. Introduction of new broad spectrum

- herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. *Proc. N. Cent. Weed Conf* **26**: 64-68.
- Beasley, R.K., R.A. Conkin, R.J. Daniels, R.M. Kramer, R. Lauer and P.E. Rogers. 1979. Dissipation of glyphosate in field soil experiments. *Weed Sci. Soc. Amer. Abstr.*: 262.
- Berlin, J. and L. Wittc. 1980. Effects of glyphosate on shikimate accumulation in tobacco cell cultures with low and high yields of cinnamoyl putrescines. *Z. Naturforsch.* **36** c: 210-214.
- Binns, A. and K. Meins. 1973. Habituation of tobacco pith cells for factors promoting cell division is heritable and potentially reversible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 2660-2662.
- Boocock, M.R. and J.R. Coggins. 1983. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Lett.* **157**: 127-133.
- Brecke, B.J. and W.B. Duke. 1980. Effects of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. *Plant Physiol.* **66**: 656-659.
- Chaleff, R.S. 1980. Further characterization of picloram-tolerant mutants of *Nicotiana tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* **58**: 91-95.
- Chaleff, R.S. 1981. Genetics of Higher Plants, Cambridge Univ. Press, New York. 184 pp.
- Chaleff, R.S. 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. *Science* **219**: 676-682.
- Chaleff, R.S. and R.L. Keil. 1981. Genetics and physiological variability among cultured cells and regenerated plants of *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.* **181**: 254-258.
- Chaleff, R.S. and M.F. Parsons. 1978. Direct selection for herbicide-resistant mutants of *Nicotiana tabacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 5104-5107.
- Chaleff, R.S. and R.B. Ray. 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science* **223**: 1148-1151.
- Comai, L., D. Faccitti, W.R. Hiatt, G. Thompson, R.E. Rose and D.M. Stalker. 1985. Expression in plants of a mutant *aro* A gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* **317**: 741-744.
- Comai, L., L.C. Sen and D.M. Stalker. 1983. An altered *aro* A gene product confers resistance to herbicide glyphosate. *Science* **221**: 370-371.
- Foley, M.E., E.D. Nafziger, F.W. Slife and L.M. Wax. 1983. Effect of glyphosate on protein and nucleic acid synthesis and ATP levels in common cockle bur (*Xanthium pensylvanicum*) root tissue. *Weed Sci.* **31**: 76-80.
- Gaitonde, M.K. and M.W. Gordon. 1958. A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid. *J. Biol. Chem.* **230**: 1043-1050.
- Ganson, R.J. and R.A. Jensen. 1985. Distinctive properties of two isozymes of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase in *Nicotiana sylvestris*. *FEBS Lett.* **159**: 117-124.
- Gottrup, O., P.A. O'Sullivan, R.J. Schraa and W.H. Born. 1976. Uptake, translocation, metabolism and selectivity of glyphosate in canadathistle and leafy spurge. *Weed Res.* **16**: 197-201.
- Hance, R.J. 1976. Adsorption of glyphosate by soils. *Pestic. Sci.* **7**: 363-366.
- Hoagland, R.E. 1980. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. *Weed Sci.* **28**: 393-400.
- Hoagland, R.E. and S.O. Duke. 1982. Biochemical effects of glyphosate. In *Biochemical Responses Induced by Herbicides*, D.E. Moreland, B.S.J. Judith and F.D. Hess (eds.), Plenum Press, New York. pp. 175-206.
- Hölländer, H. and N. Amrhein. 1980. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.* **66**: 823-829.



- Jaworski, E.G. 1972. Mode of action of N-(phosphonomethyl)glycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agr. Food Chem.* **20**: 1195-1205.
- Jensen, R.A. 1985. The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiol. Plant.* **66**: 164-168.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **18**: 100-127.
- Mousdale, D.M. and J.R. Coggins. 1984. Purification and kinetics of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from seedling of *Pisum sativum* L. *Planta* **160**: 78-83.
- Múnoz-Rueda, A., C. Coñalez-Murua, J.M. Becerril and M. Sanchez-Diaz. 1986. Effects of glyphosate (N-phosphonomethyl-glycine) on photosynthetic pigments, stomatal response and photosynthetic electron transport in *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*. *Physiol. Plant.* **66**: 63-68.
- Nagels, L., C. Debeut and E. Esmans. 1980. Quantitative determination of quinic acid and derivatives by high-performance liquid chromatography after derivatization with *p*-bromophenacyl bromide. *J. Chromato.* **190**: 411-417.
- Pihakaski, S. and K. Pihakaski. 1980. Effects of glyphosate on ultrastructure and photosynthesis of *Pellia epiphylla*. *Ann. Bot.* **46**: 133-141.
- Rubin, J.L., C.G. Gains and R.A. Jensen. 1982. Enzymological basis for herbicidal action of glyphosate. *Plant Physiol.* **70**: 833-839.
- Rubin, J.L., C.G. Gains and R.A. Jensen. 1984. Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol.* **75**: 839-845.
- Rueppel, M.L., B.B. Brightwell, J. Schafer and J.T. Marvel. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Agr. Food Chem.* **25**: 517-523.
- Singer, S.R. and C.N. McDaniel. 1984. Selection of amitrole tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plants and progeny. *Theor. Appl. Genet.* **67**: 427-432.
- Singer, S.R. and C.N. McDaniel. 1985. Selection of glyphosate-tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plants. *Plant Physiol.* **78**: 411-416.
- Sprinkle, P., W.F. Meggitt and D. Penner. 1975a. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* **23**: 224-228.
- Sprinkle, P., W.F. Meggitt and D. Penner. 1975b. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* **23**: 229-234.
- Steinrücken, H.C. and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **94**: 1207-1212.
- van Rensen, J. J. S. 1974. Effects of N-phosphonomethyl-glycine on photosynthetic reactions in *Scenedesmus* and in isolated spinach chloroplasts. In Proc. 3rd Int. Cong. Photosynthesis, M. Avron (ed.). Vol. 1, Elsevier Sci. Pub. Co., Amsterdam. pp. 683-687.
- Wyrill, J.B. III. and O.C. Brunside. 1976. Adsorption, translocation and metabolism of 2,4-D and glyphosate in common milk weed and hempdogbane. *Weed Sci.* **24**: 557-566.