

노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)와 그 동포종들에 있어서 Gramoxone 의 독성에 관한 비교 연구

최영현 · 이원호 · 유미애*

부산대학교 자연과학대학 생물학과, 분자생물학과*
(1992년 12월 14일 접수)

Comparative Toxic Effects of Gramoxone in the *D. melanogaster* and its Sibling Species

Yung Hyun Choi, Won Ho Lee and Mi Ae Yoo*

Department of Biology and Molecular Biology*, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan, Korea

(Manuscript received 14 December 1992)

Abstract

Physiological toxic and mutagenic effects of gramoxone in *Drosophila melanogaster* were investigated. Gramoxone was highly toxic on the development, resulting in of lowering the viability and in prolongation of the developmental times. Adults treated with gramoxone during the developmental stages caused a lowering of the productivity and a little change in protein quantity. But the effect on the sex-linked lethal mutagenesis was found to be negative.

The order of mortality causing adult stage feeding to gramoxone in the *D. melanogaster* complex was like this ; *D. mauritiana*, *D. sechellia*, *D. simulans* and *D. melanogaster*. Two species of the *D. yakuba* complex were alike. Those results were more or less correlation with speciation of the *D. melanogaster* subgroup.

KEY WORDS : gramoxone, toxic and mutagenic effects, *Drosophila melanogaster* subgroup

1. 서 론

각종 농약의 생체내 영향과 원인을 규명하기 위해 고등동물의 경우는 주로 생화학적, 조직학적 면에서 연구들이 진척 되어져 오고 있다. 곤충의 경우 대부분의 농약들은 뇌세포 및 신경계에 작용하여 효소들의 작용을 억제시켜 운동 부전과 경련을 야기시켜 방충의 효과를 가지게 하는데, 주로 미토콘드리아의 호흡 및 산화적 인산화에 관여하는 효소계에 저해 작용을 나타낸다(Lindal and Oberg, 19

61; Kanda *et al.*, 1968). Jayasuriya와 Ratnayake (1973)은 *Drosophila melanogaster*에서 몇가지 살충제의 발암 가능성을 지적하였고, Dieter(1975)는 특정 농약의 처리 농도에 따라 염색체 돌연변이의 유발 가능성을, Lamb(1977)는 쥐에서 살충체에 의한 발암 및 DNA 변화를 보고하였다.

한편 *Salmonella*/mammalian-microsome assay에 의한 농약들의 돌연변이성 검사에서 다수가 돌연변이원성에 대한 양성 반응을 나타내었으며(Benedict *et al.*, 1977), 다른 종류의 미생물을 이용한

검출계에서도 높은 유전적 독성 및 발암성을 띠는 것으로 보고되어져 오고 있다(Bridges, 1978). 포유동물 배양 세포 검출계를 이용한 실험에서도 높은 세포 독성과 발암성이 검출되었으며(O'Neill *et al.*, 1981), 상기 미생물계를 이용한 1차 screening계에 따르면 돌연변이원성을 나타내는 환경성 유해물질의 90% 이상이 발암성을 나타내므로(Ames *et al.*, 1975; McCann *et al.*, 1975; Ames, 1979; Maron and Ames, 1983) 돌연변이원성에 대한 양성 반응의 결과들에 주목 하여야 할 것이다.

*Drosophila*는 그 실험적 조건의 우수성으로 인해 Bateman 등(Bateman, 1956; Chandley and Bateman, 1960; Bateman and Chandley, 1964)의 선행연구 이래 화학 물질들의 돌연변이원성이나 유해성의 검정에 대한 연구로서 오랜 역사를 지닌다.

*Drosophila*를 이용한 치사 돌연변이 유발 효과 검정을 위해서는 다양한 marker gene을 가진 돌연변이체들이 사용 되어져 왔다. 이러한 치사 돌연변이를 일으키는 유전자는 현재 X 염색체상에 약 250 좌, 제 2, 제 3 염색체상에 각각 450-500 좌위 정도로 알려져 있으며, 또 하나의 유전자를 대상으로 할 경우 비교적 수백배의 검출 효율이 있는 것으로 알려져 있다(Moriwaki, 1979). 또한 상염색체상에 생기는 돌연변이 검출보다는 X 염색체상에 유발되는 변이 검출이 실험조작 및 분석면에서 비교적 간단한 것으로서, CIB법을 개량한 Muller-5법(또는 Basc법)이나 attached-X법이 주로 사용되어져왔다. 특히 attached-X법은 단세대에서 분석이 가능하므로 경제적인 검출계로 알려져 있다(Moriwaki, 1979; Inoue, 1983).

한편 Lemeunier와 Ashburner(1976)에 의한 *D. melanogaster* subgroup내 수종의 염색체 분석을 통한 계통 발생학적 보고 이래 종간 유연관계에 관한 많은 연구가 진척되어져 오고 있다. Eisses *et al.* (1979)과 Gonzalez *et al.*(1982)은 전기영동을 통한 효소와 단백질의 수준에서 그 유연성을 분석하였고, Lemeunier *et al.*(1986)은 상기 subgroup의 8종에 대한 분류, 염색체 및 생태적 측면의 특징을 조사한 후 두 complex로 분류 할수 있음을 제안하였다. 이는 이미 많은 연구에서 보고 된바 있는 분류적, 유전적

및 생화학적 수준의 결과들(Cariou, 1987; Gonzalez *et al.*, 1982; Jallon and David, 1987)과도 잘 일치되며, 최근의 2차원 전기영동과 잡종형성 및 미토콘드리아 DNA의 분석(Solignac and Monnerot, 1986; Lee and Watanabe, 1987; Lee *et al.*, 1990)과도 동일함을 알수 있다. 이 두 complex는 *D. melanogaster* complex와 *D. yakuba* complex로서 전자는 *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* 및 *D. sechellia*로 구성되며, 후자는 *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. teissieri* 및 *D. orena*로 구성되어 있다. *D. melanogaster* complex의 4종은 *D. yakuba* complex에 비하여 그 유연관계가 보다 근연이며 특히 *D. simulans*와 *D. mauritiana*는 8종중 가장 유연관계가 가까운 종으로 보고 되어 지고 있으나, *D. sechellia*와의 관계는 실험방법에 따라 *simulans* 또는 *melanogaster*에 서로 다른 근연성을 지니는 것으로 나타났다(Coyne and Kreitman, 1986; Lachaise *et al.*, 1986; Cariou, 1987).

Lee *et al.*(1985)은 intercalating agent인 ethidium bromide(EtBr)에 대한 유전적 독성영향을 *D. melanogaster* subgroup 6종을 대상으로 비교한바 있으며, ethyl methanesulfonate(EMS)에 대한 *D. melanogaster* complex 4종에 대한 발육단계상 및 성체에 대한 독성 영향 비교를 보고한바 있다(Lee and Lee, 1990). 또한 유기비소제 농약 neoasozine에 대한 *D. melanogaster* subgroup 6종에 대한 독성을 비교 하여 환경성 유해 물질에 대한 저항성이 종분화의 과정과 다소 연관성이 있음을 시사하였다(Choi and Lee, 1991).

본 연구에서는 현재 일반적으로 많이 사용되고 있는 제초제인 gramoxone이 *D. melanogaster*에 미치는 생리 독성 정도를 생존율, 발육속도, 생산력과 수용성 단백질에 대한 영향등의 비교로 조사하고, attached-X법에 의한 반성 치사 돌연변이 유발 여부 및 *D. melanogaster* subgroup 6종에 대한 독성 정도를 비교 분석 하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

Gramoxone에 의한 발육단계상 미치는 독성 정도와 생산력 및 수용성 단백질에 대한 영향을 조사하기 위하여 *D. melanogaster*의 표준종인 Oregon-R(OR) strain을 사용 하였으며, 반성치사 돌연변이 유발효과의 검정을 위하여 attached-X 염색체를 가진 돌연변이체(*ywmf & yf: =*)를 사용하였다.

성체에서의 종간 독성효과 비교를 위해서는 *D. melanogaster* subgroup에 속하는 두 complex(*D. melanogaster* complex ; *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* and *D. sechellia*, *D. yakuba* complex ; *D. yakuba* and *D. erecta*) 6종이 사용되었으며 이는 모두 일본 국립 유전학 연구소로부터 분양 받아 25°C 항온사육실에서 계속 유지되어 온 종들이다.

*Drosophila*의 배지는 corn meal-agar 표준 배지였고 gramoxone(1.1'-dimethyl-4-4'-dipyriium dichloride, Samkong Co., Korea)의 처리는 5% sucrose(Junsei Chemi., Japan)용액에 희석하여 사용하였으며 대조구에는 동일량의 5% sucrose 용액만을 처리하였다.

2.2. 실험방법

1) 발육단계상의 영향

우화후 2~3일령의 미교배 상대 *D. melanogaster* 암수를 15~20쌍 정도로 표준 배지가 든 사육병(3×10cm)에서 교배시켜 12시간 경과후 새 사육병으로 옮겨 약 8시간 동안 산란시킨후 성체를 제거하였다. 성체 제거 즉시 알을 계수하여 1령기 유충시기(24±4 hr)에 gramoxone을 각 농도당, 사육병당 250μℓ 씩의 농도별 처리액을 배지표면상에 투여하여 약 9일후부터 우화해 나오는 성체를 15일째까지 24시간 간격마다 계수하여 생존율과 발육속도등을 분석하였고, 우화해 나온 성체들의 자손생산력 비교를 위해서는 우화 1일후 사육병당 농도당 7쌍씩 교배시켜 매 24시간마다 새로운 배지로 transfer하여 연속 6단계(A-F)를 얻어 F₁을 대상으로 2회 반복 조사하였다.

2) SDS-PAGE에 의한 수용성 단백질 분석

유충기에 gramoxone 처리후 우화된 성체들의

수용성 단백질 변이 여부를 조사하기 위한 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 기본적으로 Laemmli(1970)의 방법을 따랐다. 준비된 sample에 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol과 10% sucrose가 되도록 시료를 만든후 소량의 bromophenol blue(0.002%)를 tracking marker로 사용하여 gel의 well당 약 40μℓ씩 loading 하였다. 4%의 stacking gel과 13%의 resolving gel에 각각 60V, 2시간 30분 및 100V, 5시간 running을 하였고, 전기영동이 끝난 gel은 0.1% coomassie brilliant blue R250에서 염색후 탈색 하였다. 탈색된 gel은 densitometer(Shimadzu dual-wavelength thin-layer chromatoscanner, Mode Cs-930, 570nm)로 scanning후 각 band를 비교하였다. 분리된 band들의 분자량 비교를 위해 marker protein으로 bovine serum albumin(68,000 dalton), ovalbumin(43,000 d.), carbonic anhydrase(29,000 d.), lysozyme(14,300 d.) 및 ribonuclease-A(13,700 d. ; Sigma, USA)를 사용하였다.

3) 반성 치사 돌연변이 유발 조사

Attached-X법을 이용하여 gramoxone에 의한 반성 치사 돌연변이 유발여부를 비교 조사하였다. 교배법에 의한 검정에서 처리된 수컷이 유전적으로 정상이라면 F₁의 암수 성비가 1:1이 될 것이며, 처리된 수컷의 X 염색체상에 치사 돌연변이가 유도되었다면 수컷의 비율은 그 유발 정도에 따라서 감소하게 될것이다. 처리액의 투여는 Lewis와 Bacher (1968)의 방법에 준하여 멸균된 tissue paper를 사육병에 약 1cm 정도의 높이로 채우고 농별별 처리액을 4ml 정도 충분히 흡수 시켜둔 후 약 2시간 starvation시킨 2-3일령의 수컷을 사육병당 40개체씩 넣어 24시간 동안 섭식시킨후 교배에 사용하였다. 본 실험법에 의한 반성 치사 돌연변이 유발효과에 대한 positive group으로서 이미 잘 알려진 강력한 돌연변이원인 methyl methaesulforate (MMS, Sigma, USA) 2.5 mM을 동일 방법으로 처리하였다.

4) 성체에서의 독성 효과 비교

Vogel과 Luers(1974)의 경구 투여방법에 준하여

gramoxone의 농도별 처리액을 100ml 비이커 속에 약 17-20ml씩 넣어두고, 30ml glass filter 속에 상기 두 complex 6종의 2-3일령 수컷 성체를 50개체씩 넣어 filter 면이 처리용액에 침적되게하여 성체들이 경구 섭식을 할수 있게 하였다. 매 24시간 마다 사체수를 계수하여 168시간까지의 누가 기록 결과를 2회 반복 실시하여 중별, 농도별에 따른 성체들의 gramoxone에 대한 저항성 정도를 비교 분석하여 독성 효과를 조사하였다.

이상의 모든 실험은 25°C 항온 사육실에서 실시되었다.

3. 실험 결과

3.1. 발육단계상의 독성 효과

D. melanogaster(OR)의 유충발생기에 미치는 gramoxone의 독성효과를 조사하기 위해 1령기 유충 시기(24 ± 4 hr)에 농도별 투여후 성체까지의 생존율과 발육속도를 비교하였고, 그 성체들의 자손생산력의 변화 정도를 연속적 brood별로 분석하였다.

생존율은 총 산란수에 대한 우화된 성체의 비율로 나타내었으며, 발육속도는 각 개체당 우화까지의 일수를 모두 합하여 전체 개체수로 나누어서 산출하였다. 대조구를 포함하여 총 1,393개의 계수된 알중 1,100개체의 성체를 얻었으며 그 결과는 Table 1과 같고 대조구를 1로 한 상대적 생존율과 상보적 발육속도를 Fig.1에 도식화 하였다.

대조구의 생존율은 평균 0.833이었으며 5.0%와 10.0% 처리구에서 각각 0.780, 0.749로 농도증가에 따른 생존율의 감소 경향을 보였다. 발육속도는 대조구에서 평균 10.401일 이었고 5.0% 처리구에서는 11.180일로, 10.0% 처리구에서는 12.134일로 나타나 대조구에 비하여 각기 1.075배와 1.167배로 상당히 지연 되었다. 유충기에 gramoxone이 처리된 후 우화된 성체들의 생산력은 대조구에 비해 다소 줄었으나 brood가 진행됨에 따라 대조구와 처리구의 차이점은 거의 발견할 수없이 유사한 경향을 나타내었고, 전체 6일간의 생산력은 농도 의존적으로 처리구들에서 다소 낮게 나타났다(Fig. 2).

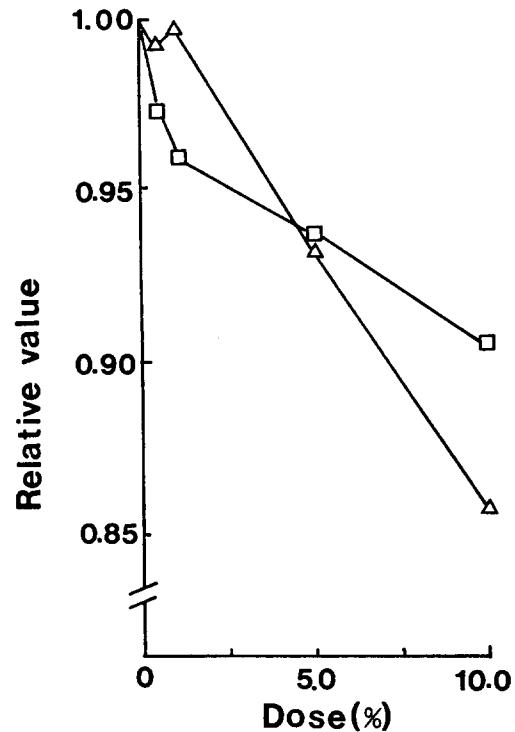


Fig. 1. The relative value of the viability(□) and the reciprocal of the relative developmental time(△) in *D. melanogaster* to gramoxone treated medium.

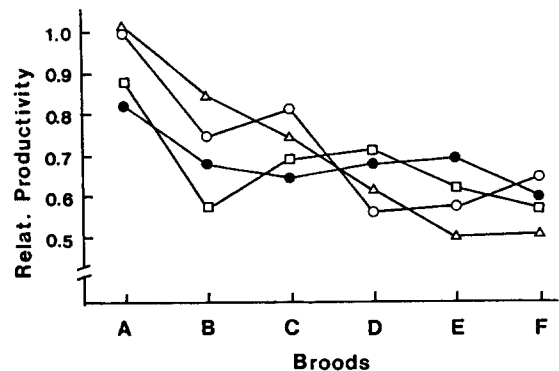


Fig. 2. Change of productivity during 6 days after the 1st instar larvae fed with gramoxone (average of 14 pairs at each concentration). ○ ; control, △ ; 1.0%, □ ; 5.0%, ● ; 10.0%

Table 1. Viability and developmental time to gramoxone of *D. melanogaster* after the 1st instar larvae feeding (average of two replicates at each concentration)

Concentrations (%)	Adults/Eggs	Viability	Developmental time (days)
0.0	267/320	0.833	10.401
0.5	240/306	0.793	10.542
1.0	224/285	0.788	10.412
5.0	205/263	0.780	11.180
10.0	164/219	0.749	12.134

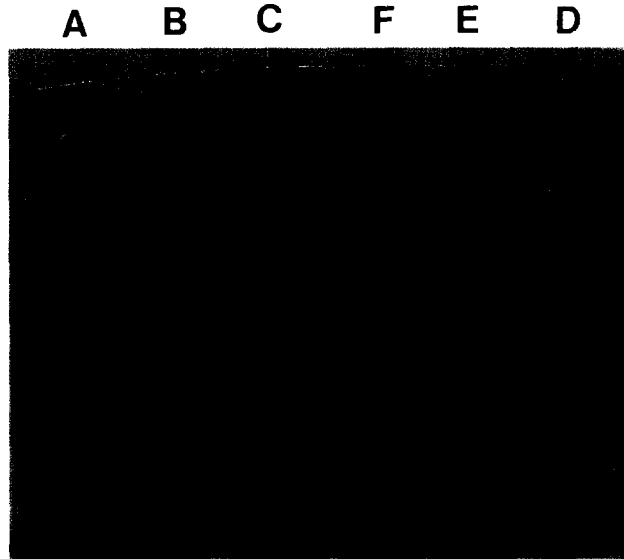


Fig. 3. SDS-PAGE protein banding patterns of the control and the gramoxone-treated groups of *D. melanogaster* at the 1st instar larvae.

A, control(males) ; B, 5.0% treatment(males) ; C, 10.0% (males) D, control(females) ; E, 5.0% (females) ; F, 10.0% (females)

3.2. 수용성 단백질에 대한 영향

유충발생기에 gramoxone이 투여된후 우화 되어 나온 성체들을 대상으로 SDS-PAGE법에 의한 수용성 단백질의 변이를 조사하여 Fig. 3에 나타내었으며 이를 densitometric scanning하여 Fig. 4에서 비교하였다. Fig. 4의 결과에서 볼수 있듯이 수컷의 경우 band a, b, c와 d가 양적으로 다소 감소되었으며 e는 증가되어 전체 단백질 조성 중 고분자량 범위에 더 영향을 준것으로 나타났다. 암컷의 경우 band f, g가 대조구에 비하여 gramoxone의 처리 농도가

증가 할수록 양적으로 약간 증가 되었고 band h와 i는 다소 감소되는 경향을 보여 저분자량 범위의 band들에서 변이가 더 많았다. 그러나 완전한 성체로 우화되어 나온 처리구 성체들의 수용성 단백질은 대조구와 비교하여 새로운 band의 합성이나 완전 소멸은 발견 할수 없었으므로 전체적인 단백질 조성의 변화에는 크게 영향을 미치지 못한 것으로 나타났다.

3.3. 반성 치사 돌연변이 유발 효과

Gramoxone 처리로 인한 *D. melanogaster*의 X

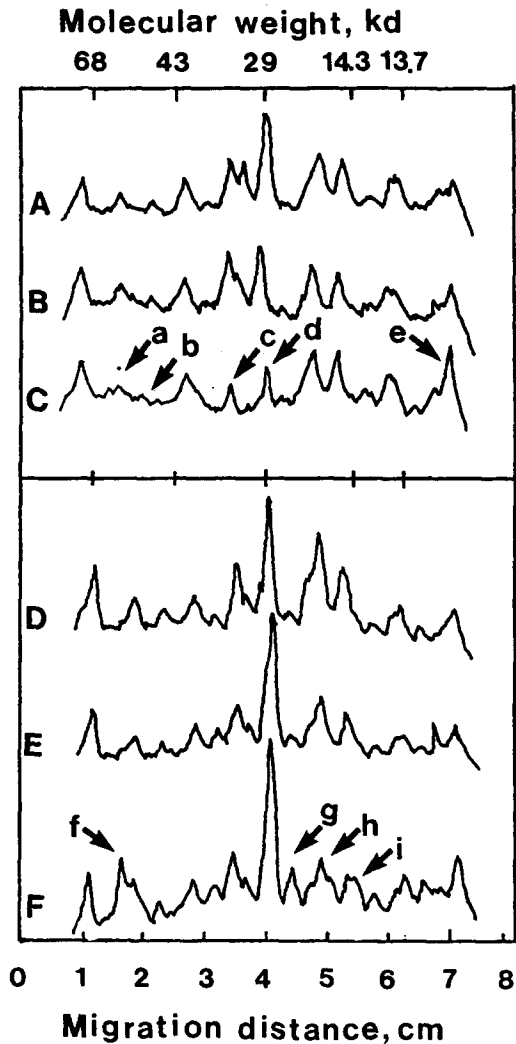


Fig. 4. Densitometric recordings of the electrophoretic patterns of the control and the gramoxone-treated groups of *D. melanogaster*. Symbols are the same as in Fig. 4.

염색체상 치사 돌연변이 유발여부를 attached-X법으로 분석한 결과는 Table 2와 같이 나타났다.

대조구는 자손의 성비가 0.543이었으며 3가지 처리구에서도 이와 유사한 0.532에서 0.541 정도의 수준으로 나타났다. Positive group으로 MMS를 2.5 mM 처리하였을 경우는 0.439로 나타났다.

이상의 대조구(우 : ♂ = a : b)와 실험구(우 : ♂ = c : d)에서 나타난 결과를 근거로 대조구에 대한 처리구의 상대 치사 index($1 - ad/cb$)를 구하였다.

이 index는 치사효과가 전혀 없을 경우 0에 가까울 것이고 attached-X법에 의한 F1 중 수컷의 출현이 전혀 없는 경우, 즉 완전 치사 변이를 유도한 경우 index는 1이 될 것이다. 결과에서 볼수 있듯이 positive group의 0.3408에 비하여 gramoxone의 처리구는 거의 0에 가까와 attached-X법에 의한 X 염색체상의 치사 돌연변이 유발에 거의 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

3.4. *D. melanogaster* subgroup에 대한 독성 효과 비교

D. melanogaster subgroup의 두 complex 6종의 성체들에 대한 gramoxone의 독성정도를 경구 투여로 인한 시간 경과에 따른 사체 수가 조사로서 비교하였다.

먼저 *D. melanogaster* complex의 4종에 대한 결과는 Fig. 5에 나타내었듯이 대조구에 비하여 처리구들은 높은 치사율을 보여 1.0% 처리구에서 168 시간 경과후 *D. melanogaster*가 완전치사를 보였으며, 144시간 경과후 *D. simulans*는 98% 정도의 치사를, *D. mauritiana*와 *D. sechellia*는 완전 치사를 나타내었다. 0.3%의 저농도 처리구들에서의 치사율도 고농도에서 처럼 *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. melanogaster*의 순서였다.

상기 결과들로 부터 120시간 경과후의 50% 치사를 나타내는 LC₅₀ 농도의 값을 산출한 결과(Table. 3), *D. melanogaster* complex에서 *D. mauritiana*가 0.436%로 gramoxone에 대한 독성효과가 최고였으며, *D. sechellia*가 이와 비슷한 수준이었고 *D. melanogaster*는 0.943%로 상대적으로 강한 저항성을 보였음을 알수 있었다.

D. yakuba complex의 두종에 대한 결과(Fig. 6 & Table 3)에서는 LC₅₀의 값이 각기 0.331%와 0.317%로 산출되어져 *D. erecta*가 다소 낮거나 유사한 경향으로 나타났다. 동일한 방법에 의한 유기비소제 농약 neoasozine에 대한 72시간 경과후의 LC₅₀ 값

Table 2. Sex-ratio of progenies from the crosses between attached-X females(yf : =) and gramoxone treated males of *D. melanogaster*

Concentrations (%)	No. of crosses	Total flies counted (♀ · ♂)	Sex-ratio (♂/♀ + ♂)	Indexes (1-ad/cb)
0.0	34	2,120(969. 1,151)	0.543	0.0000
0.3	31	1,980(927. 1,053)	0.532	0.0437
0.6	27	1,750(808. 942)	0.538	0.0185
1.0	29	1,820(835. 415)	0.541	0.0069
MMS 2.5mM	30	945(530. 415)	0.439	0.3408

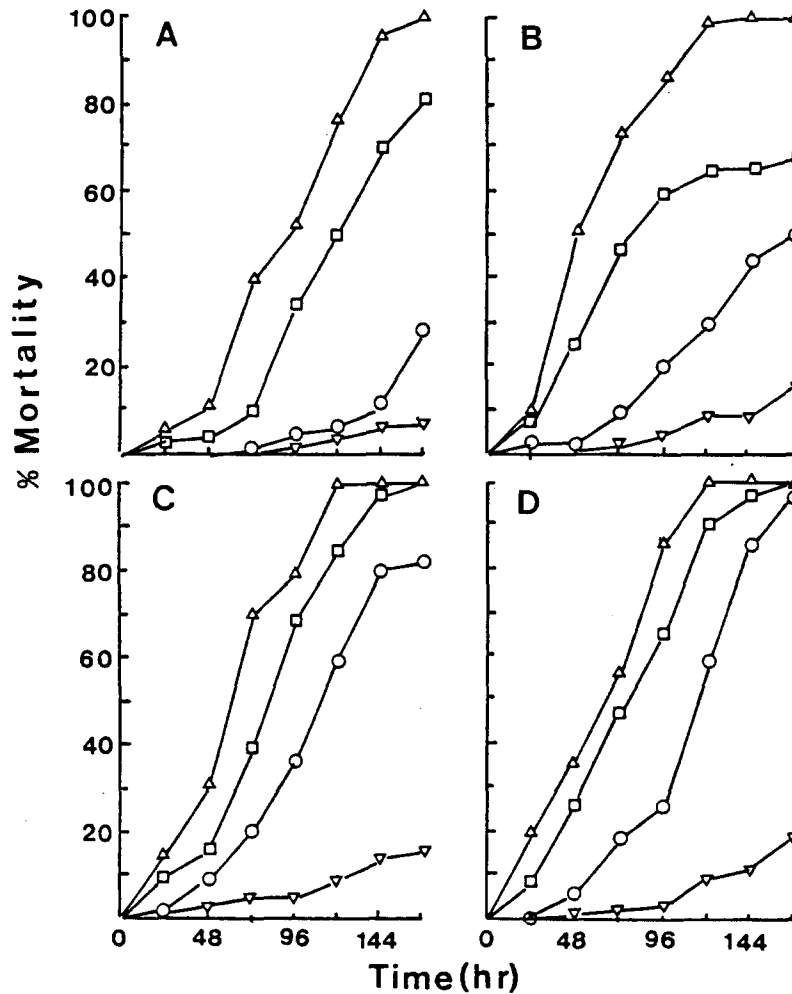


Fig. 5. Exposure-mortality relationships to gramoxone of the *D. melanogaster* complex males after adult feeding (average of two replicates at each concentration).
 A ; *D. melanogaster*, B ; *D. simulans*, C ; *D. mauritiana*, D ; *D. sechellia*.
 ▽ ; control, ○ ; 0.3%, □ ; 0.6%, △ ; 1.0%

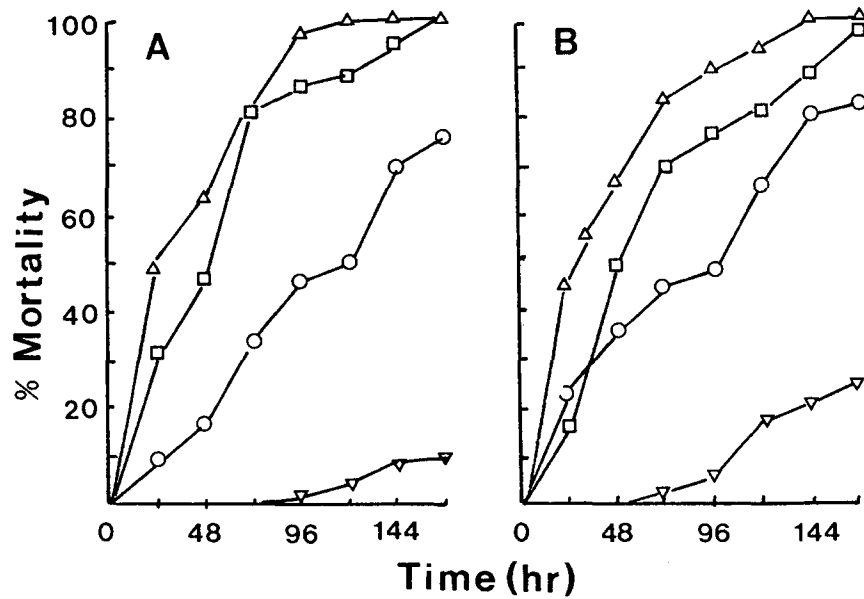


Fig. 6. Exposure-mortality relationships to gramoxone of the *D. yakuba* complex males after adult feeding(average of two replicates at each concentration). Symbols are the same as in Fig. 5.

A ; *D. yakuba*, B ; *D. erecta*.

(Choi and Lee, 1991)을 Table 3에서 비교하였다.

Table 3. Comparative LC₅₀ values at 120 hr in the *D. melanogaster* subgroup

Species	Gramoxone(%)	Neosozin(%) ^{a)}
<i>D. melanogaster</i>	0.943	1.48
<i>D. simulans</i>	0.525	1.34
<i>D. mauritiana</i>	0.436	1.27
<i>D. sechellia</i>	0.488	1.37
<i>D. yakuba</i>	0.331	1.51
<i>D. erecta</i>	0.319	1.83

a) : at 72 hr from choi and Lee(1991)

상기 결과들에서 *D. yakuba* complex가 *D. melanogaster* complex에 비하여 gramoxone의 저항성이 상대적으로 약함을 알수 있었고, 전체적으로 조사된 *D. melanogaster* subgroup 6종중 *D. melanogaster*가 가장 강한 저항성을 나타내었으며 *D. mauritiana*와 *D. sechellia*가 중정도의 독성효과를 나타내었다.

4. 고 찰

Gramoxone 또는 paraquat는 1955년에 발견된 제초제로 50년대 말부터 널리 쓰이기 시작하여 우리나라에서도 1970년 부터 생산, 시판되어온 paraquat 성분 농약의 상품명이다. 이는 직접적인 접촉으로 피부, 시각기, 호흡기와 위장관의 상피세포에 손상을 줄수 있으며, 인간에게서 10ml의 소량 복용으로도 폐, 간, 심장 및 중추신경계 전신에 손상을 주며 특히 폐에 진행성 섬유화를 일으켜 폐부전증으로 90% 이상의 높은 사망율을 보인다(Yu *et al.*, 1984).

현재 gramoxone 성분의 paraquat로 인한 작용 기전이 확실하지는 않으나 paraquat가 체내에 유입되면 환원되어 paraquat radical이 되고 산소 분자에 의해 산화되는 과정에서 superoxide radical이 형성된다. 이는 다시 환원되어 H₂O₂를 형성하는데 이들이 세포막의 형성을 방해 하여 조직에 손상을 준다(Rose *et al.*, 1976).

이러한 gramoxone이 *D. melanogaster*의 발육 단계상 미치는 독성 정도, 반성 치사 돌연변이 유발 정도 및 *D. melanogaster* subgroup에 속하는 6종의 성체를 대상으로 감수성을 비교 조사 하였다. 발육 단계상의 독성 정도는 gramoxone을 농도별로 1령기 유충시기(24 ± 4 hr)에 처리한후 성체까지의 생존도와 발육속도를 조사하였고, 우화하여 나온 성체들의 자손 생산력과 수용성 단백질에 대한 영향을 비교 분석 하였다. 아울러 gramoxone에 의한 반성 치사 돌연변이 유발 여부를 attached-X법에 의하여 조사 하였다.

먼저 발육 단계상의 처리는 gramoxone의 농도가 증가할수록 생존율의 저하와 발육속도의 지연 및 생산력의 상대적 저하 효과를 나타내어 gramoxone이 *D. melanogaster*의 발육 단계상에 강한 독성을 미쳤음을 알수있었다. 이는 배지내 의약품 처리 농도의 증가에 따른 발육 속도의 지연(Luning, 1966)이나, 중금속, 식품 첨가물 및 살균제, 살충제, 유기비소제 농약들의 투여 농도에 따른 생존율의 저하와 발육속도의 지연 및 생산력의 감소(Sorsa and Pfeiffer, 1973 ; Mathew and Aldoori, 1976 ; Inoue and Watanabe, 1978 ; Choo, 1982 ; Choi and Lee, 1991)등의 결과와 매우 일치됨을 알수 있으며, Kondo *et al.*(1985)은 생체내 여러 물리적, 화학적 저해요소들에 의해서 생기는 발육의 지연 효과는 그러한 유해 인자들에 의해서 상해를 입은 세포군들 대신에 살아 남은 정상의 세포군을 증식시켜 대항시키기 위한 필요의 시간으로 보았다.

카드뮴과 방부제로 사용되었던 furylfuramide (AF-2)의 처리에서는 발육속도를 유의적으로 지연시키지만, 몇가지 살충제와 농약에서는 발육속도에 대체로 영향이 없고 생존율을 크게 저하시키거나 살충제에 따라서도 산란력의 억제 영향이 다르다는 선행 연구들(Laamanen *et al.*, 1976 ; Inoue and Watanabe, 1978 ; Inoue, 1980 ; Choi and Lee, 1991)과 본 결과의 비교에서, gramoxone은 발육속도의 지연과 생존율 저하에 동시에 많은 영향을 주었으며 상대적 발육속도의 상대치가 생존율 보다 저하되어, 발육속도의 지연이 독성 정도의 측정에 가장 가장 민감한 감수성을 띤다는 점(Inoue and

Watanabe, 1978)과 잘 일치되어 gramoxone은 발육 단계상에 강한 독성을 미친것으로 나타났다. 어떤 화학물질의 유전적 변이원성을 조사하기 전에 이상과 같은 발육단계상의 생리적 독성 평가는 중요한 의미를 지닌다. 생리적 영향이 극대로 큰 경우는 생물체들이 자손을 남기지 못하고 치사되므로 그 경우 변이원성은 그다지 중요한 의미가 없기 때문이다(Inoue, 1980).

Gramoxone을 처리한후 우화된 성체들을 대상으로 SDS-PAGE법에 의해 분석한 수용성 단백질에 대한 영향은 전체적인 band 양상에서는 큰 변화를 주지 않았지만 부분적인 단백질의 양적인 변화가 일어 났으며 이는 생체내 단백질의 합성과정에서 gramoxone이 다소 영향을 미친것으로 사료된다. 이처럼 대조구와 큰 차이가 없는 것은 Kondo *et al.*(1985)의 견해처럼 상해 받은 세포군들 대신에 발육이 지연되면서 까지 많은 세포들이 정상 세포군으로 증식되었기 때문으로 사료되며, Summer *et al.*(1986)에 의하면 *Drosophila*의 단백질 합성 양상은 발육 단계별로 큰 차이가 나며 특히 발생 초기의 단백질 조성은 불과 4-5 시간의 간격마다 급속히 변화한다고 하였고, 특히 타 곤충의 특징에서와도 마찬가지로 *Drosophila*의 완전 변태 과정중 pupa 단계에서 원기 세포에 의한 조직의 분화가 완전해 지므로(Russel, 1982) 환경성 저해 물질들에 의한 단백질 수준의 조사는 좀더 세밀한 보완이 요구되어져야 할것으로 생각된다.

Laamanen *et al.*(1976)은 세포 대사계에 영향을 주는 amitrole을 처리하였을 경우 성 염색체의 불 분리 현상이나 반성 열성 치사 돌연변이의 유발을 일으키지는 못하였다고 하였으며, Inoue와 Watanabe(1978)는 카드뮴과 AF-2에 의해서는 제 1 및 제 2 염색체상의 열성돌연변이 유발이 없었다고 보고하였다. Muller-5법과 본 연구와 동일한 attached-X법에 의한 중금속, AF-2 및 몇종의 살충제에서도 대조구와 별다른 유의적 차이점은 없었으나(Inoue, 1980), Ramel과 Magnusson(1967)은 수은 화합물에 의해 *Drosophila*의 발생이 비정상적으로 유도 되었다고 하였으며, Mathew와 Aldoori(1976)은 수은성 살균제의 처리가 X 염색체상의 열성 치사

인자 유발율을 높인다고 보고한 바 있다. Choo(1982)는 납과 카드뮴 화합물을 처리하여 10세대 이내에 제 2 염색체상의 유해 유전자 빈도가 증가 되었다고 하였다.

Inoue(1984)는 살선충제(D-D 또는 DBCP)가 *Bacs*법에 의한 반성 열성 치사 돌연변이 빈도를 유의적으로 증가 시켰다고 하였으나, attached-X법에 의한 gramoxone의 반성 치사 돌연변이 유발 정도에 대해서는 gramoxone 처리구들의 성비와 대조구의 성비를 비교해 볼때 별다른 차이가 없었으므로 본 실험법에 의해서는 돌연변이원성을 검출할수가 없었다.

현재까지 알려진 *D. melanogaster* subgroup에 속하는 8종은 두개의 complex로 구분할수 있다(Lemeunier *et al.*, 1986 ; Lee and Watanabe, 1987 ; Cariou, 1987 ; Lee *et al.*, 1990). 한편 *Drosophila*에 효과적으로 화학물질을 주입시키기 위한 방법으로 현재 경구 투여법과 복강내 주사 주입법의 두가지가 널리 사용되고 있다. 후자의 경우는 약품 투여를 정량적으로 할수있다는 장점을 지니나 그 주입 과정의 기술적인 난점과 감도가 일반적으로 경구 투여법 보다는 낮다고 하는 단점을 지니고 있다. Marcose *et al.*(1982)은 본 실험에서와 동일한 경구 투여법에 의해 EtBr의 독성을 조사해본 결과 *D. melanogaster*가 *D. simulans*보다 강한 저항성을 가진다고 보고하였으며, Lee *et al.*(1985)은 상기 subgroup의 6종에 대한 독성의 비교에서 *D. simulans*와 *D. mauritiana*가 저농도군에 속하고 *D. melanogaster*가 중간 정도의 저항성을 가지며, *D. teissieri*, *D. yakuba* 및 *D. erecta*가 비교적 고농도 저항성을 띠고 있어 전체적으로 *D. yakuba* complex가 *D. melanogaster* complex에 비하여 독성에 대한 저항성이 다소 강하다고 하였다. 또한 EMS에 대한 *D. melanogaster* complex의 독성 검사에서도 EMS 투여에 대한 치사율이 *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. simulans* 그리고 *D. melanogaster*의 순서였으며(Lee and Lee, 1990), 이 결과들은 *D. melanogaster* subgroup의 종분화 과정과도 다소 연관성이 있음을 시사하였다.

같은 농약이지만 그 작용이 서로 다른 neoasozine에 대한 독성의 정도(Choi and Lee, 1991)와 본

연구의 결과인 gramoxone에 대한 LC₅₀ 값을 Table 3에서 비교하였다. 6종 모두에서 neoasozine에 비하여 gramoxone이 그 독성의 정도는 훨씬 낮게 나타났으며 neoasozine 처리의 경우는 EtBr의 경우와 매우 유사한 경향을 보였음을 알수 있으나, gramoxone이 경우 *D. yakuba* complex보다 *D. melanogaster* complex의 저항성이 더 강하였으며 *D. melanogaster* complex에서의 치사율은 *D. mauritiana*, *D. sechellia*, *D. simulans* 그리고 *D. melanogaster*의 순이었다. 동일한 방법에 의한 상기 모든 결과들에서 무엇보다도 *D. simulans*와 *D. mauritiana*에서 독성 정도가 매우 유사하게 산출되어져 *D. melanogaster* subgroup 중 두종의 근연 관계가 가장 밀접하다는 점등(Coyne and Kreitman, 1986 ; Lachaise *et al.*, 1986 Lee and Watanabe, 1987 ; Lee *et al.*, 1990)은 전체적으로 환경성 유해물질에 대한 상대적 저항도와 *D. melanogaster* subgroup 내 종분화와도 어느 정도 연관을 지을수 있으며 이를 위해선 더욱 다양한 화학물질들을 대상으로 추가적인 자료가 요구되어져야 할것으로 사료된다.

5. 결 론

제초제 gramoxone이 *D. melanogaster*의 발육단계상 미치는 독성의 정도와 돌연변이원성을 조사하였다. Gramoxone은 *D. melanogaster*의 유충 발생기상에 생존율을 저하시키고 발육속도를 지연시키는 강한 독성을 나타내었으며, 발생도중 gramoxone이 처리된 성체는 생산력이 저하되었고 수용성 단백질에 다소 양적 변화를 초래하였으나 attached-X법에 의한 반성 치사 돌연변이는 검출되지 않았다.

성체에서의 gramoxone 투여에 따른 치사율은 *D. melanogaster* complex에서 *D. mauritiana*, *D. sechellia*, *D. simulans* 및 *D. melanogaster*의 순서였으며 *D. yakuba* complex의 두종에서는 유사한 경향을 나타내었다. 이는 *D. melanogaster*의 종분화 과정과도 다소 연관성이 있는 결과였다.

참고문헌

- 近藤 宗平, 野村 大成, 福永 昭廣, 梁 治子, 1985, 個體 發生期の X 線被ばくによる 體細胞 突然變異と 細胞 交代型 修復, 放射線生物研究, 20, 243-257.
- 森脇 大五郎, 1979, ショウジョウバエ의 遺傳實習, 培風館, 110-116pp.
- 井上 寛, 1980, 農藥, 重金屬의 昆蟲に 與える 影響, 遺傳, 34, 22-28.
- 井上 寛, 1983, ショウジョウバエに おける Base法 と 付着 X 法の 比較, 環境變異原研究, 5, 7-9.
- 井上 達生, 榎本 令子, 森谷 正明, 白順 茶彦, 1984, キイロショウジョウバエを 用いた D-D의 件性 劣性 致死 試驗, 環境變異原研究, 6, 167-169.
- Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki, 1975, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutation Res., 31, 347-364.
- Ames, B.N., 1979, Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer, Science, 204, 587-593.
- Bateman, A.J., 1956, Mutagenic sensitivity of maturing *Drosophila* sperm. I. Dominant lethals, J. Genetics, 54, 400-410.
- Bateman, A.J. and A.C. Chandley, 1964, The sensitivity of the male germ cells of *Drosophila* to methyl methanesulfonyl, Heredity, 19, 711-718.
- Benedict, W.F., M.S. Baker, L. Haroun, E. Choi and B.N. Ames, 1977, Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the *Salmonella*/microsome test, Cancer Res., 37, 2209-2213.
- Bridges, B.A., 1978, On the detection of volatile liquid mutagens with bacteria: Experiments with dichlorvos and epichlorhydrin, Mutation Res., 53, 309-316.
- Chandley, A.C. and A.J. Bateman, 1960, Mutagenic sensitivity of sperm, spermatids, spermatocytes and spermatogonia in *Drosophila melanogaster*, Heredity, 15, 363-375.
- Cariou, M.L., 1987, Biochemical phylogeny of the eight species in the *Drosophila melanogaster* subgroup, including *D. sechellia* and *D. orena*, Genet. Res. Camb., 50, 181-185.
- Choi, Y.H. and W.H. Lee, 1991, Comparative studies on the toxicity of neosozine in the *Drosophila melanogaster* subgroup, J. of Environ. Studies, Pusan Natl. Univ., 9, 61-68.
- Choo, J.K., 1982, Effects of gene frequency on heavy metal compound in *Drosophila melanogaster*, Drosophila Infor. Serv., 58, 37.
- Coyne, J.A. and M. Kreitman, 1986, Evolutionary genetics of two sibling species, *Drosophila melanogaster* and *D. sechellia*, Evolution, 40, 673-691.
- Dieter, E., 1975, Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides, Mutation Res., 32, 133-150.
- Eisses, K.T., H.van Dijk and W.van Delden, 1979, Genetic differentiation within *melanogaster* species group of the genus *Drosophila*(Sophophora), Evolution, 33, 1063-1068.
- Gonzalez, A.M., V.M. Cabrera, J.M. Larruga and A.Gullon, 1982, Genetic distance in the sibling species *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*, Evolution, 36, 517-522.
- Inoue, Y. and T.K. Watanabe, 1978, Toxicity and mutagenicity of cadmium and furylfuramide in *Drosophila melanogaster*, Jpn. J. Genet., 53, 183-189.
- Jallon, J.M. and J.R. David, 1987, Variations in cuticular hydrocarbons among the eight species *Drosophila melanogaster* subgroup, Evolution, 41, 294-302.
- Jayasuriya, V.U. and W.E. Ratnayake, 1973, Screening of some pesticides on *D. melanogaster* for toxic and genetic effect, Drosophila Infor. Serv., 50, 184-186.

- Kanda, M., K. Takahama, Y. Waseda, Y. Ishii and Y. Miyazaki, 1968, Studies on the influences of organochloric pesticides, PCP and oxidative phosphorylation of rat liver, Jpn. Leg. Med., 22, 223-236.
- Laamanen, I., M. Sorsa, D. Bamford, U. Gripenberg and T. Meretoja, 1976, Mutagenicity and toxicity of amitrole. I. *Drosophila* tests, Mutation Res., 40, 185-190.
- Lachaise, D., J.R. David, F. Lemeunier, L. Tsacas and M. Ashburner, 1986, The reproductive relationships of *Drosophila sechellia* with *D. mauritiana*, *D. simulans*, and *D. melanogaster* from the Afrotropical region, Evolution, 40, 262-271.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, Nature, 227, 680-685.
- Lamb, M.J., 1977, Mutagenicity tests with metrifonate in *D. melanogaster*, Mutation Res., 56, 157-162.
- Lee, W.H., S.J. Lee and J.T. Lee, 1985, Physiological genetic studies on the effect of ethidium bromide in sibling species of *Drosophila melanogaster*, J. of Science, Pusan Natl. Univ., 41, 187-194.
- Lee, W.H. and J.A. Lee, 1990, Genetic studies on the effects of ethyl methanesulfonate in *Drosophila melanogaster* complex (unpublished data).
- Lee, W.H. and T.K. Watanabe, 1987, Evolutionary genetics of the *Drosophila melanogaster* subgroup. I. Phylogenetic relationships based on matings, hybrids and proteins, Jpn. J. Genet., 62, 225-239.
- Lee, W.H., M.A. Yoo and J.K. Choo, 1990, Molecular genetic studies on the speciation of *Drosophila melanogaster* subgroup: Relationships based on proteins, hybrids and mitochondrial DNAs, Kor. J. Genet., 12, 317-330.
- Lemeunier, F. and M. Ashburner, 1976, Relationships within the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). II. Phylogenetic relationships between six species based upon chromosome banding sequences, Proc. R. Soc. London, 193, 275-294.
- Lemeunier, F., J.R. David, L. Tsacas and M. Ashburner, 1986, The *melanogaster* species subgroup. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*. Vol. 3e, Academic Press, 147-255pp.
- Lewis, E.B. and F. Bacher, 1968, Methods of feeding ethyl methanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males, Drosophila Infor. Serv., 43, 193.
- Lindal, P.E. and K.E. Oberg, 1961, The effect of rotenone on respiration and its point of attack, Exp. Cell Res., 23, 228-237.
- Lunung, K.G., 1966, *Drosophila* tests in pharmacology, Nature, 209, 84-86.
- Marcos, R., J. López de Sopulveda, N. Xamena and A. Creus, 1981, Effects of ethidium bromide on *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*, Experientia, 37, 559-560.
- Maron, D.M. and B.N. Ames, 1983, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, 173-215.
- Mathew, C. and Z. Aldoori, 1976, The mutagenic effect of mercury fungicide Cerasan M. in *Drosophila melanogaster*, Mutation Res., 40, 31-36.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B.N. Ames, 1975, Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals, Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 5135-5139.
- O'Neill, J.P., N.L. Forbes and A.W. Hsie, 1981, Cytotoxicity and mutagenicity of the fungicides captan and folpet in cultured mammalian cells (CHO/HGPRT system), Environ. Mutagen., 3, 233-237.
- Ramel, C. and J. Magnusson, 1967, Genetic effect of organic compound. II. Chromosome segregation in *Drosophila melanogaster*, Hereditas, 61, 231-254.

- Rose, M.S., E.A. Lock, L.L. Smith, I. Wyatt, 1976, Paraquat accumulation : tissue and species specificity, Biomedical Pharm., 25, 419-423.
- Russel, M., 1982, Imaginal discs. In : A hand book of *Drosophila* development, Elsevier Biomedical Press, 95-121pp.
- Solignac, M. and M. Monnerot, 1986, Race formation, speciation, and introgression, within *Drosophila simulans*, *D. mauritiana*, and *D. sechellia* inferred from mitochondrial DNA analysis, Evolution, 40, 531-539.
- Sorsa, M. and S. Pfeiffer, 1973, Effects of cadmium on development time and prepupal puffing pattern of *Drosophila melanogaster*, Hereditas, 75, 272-277.
- Summer, M.C., V. Bedian and S.A. Kauffman, 1986, An analysis of stage-specific protein synthesis in the early *Drosophila* embryo using high-resolution, two-dimensional gel electrophoresis, Develop. Biolo., 113, 49-63.
- Vogel, E. and H. Lüters, 1974, A comparison of adult feeding to injection in *D. melanogaster*, *Drosophila* Infor. Serv., 51, 113.
- Yu, E.S., W.H. Kim, J.G. Chi, Y.I. Kim, S.K. Lee, Y.S. Shin, K.Y. Kim and Y.C. Han, 1984, Paraquat poisoning(an autopsy case), Environ. Mutagen & Carcinogens, 4, 13-22.