

除草劑 BIALAPHOS에 對한 煙草의 耐性 增大

裴允珠* · 金吉雄*

Development of Herbicide(BIALAPHOS) Tolerant Tobacco through Tissue Culture

Bae, Y.Z.* and K.U. Kim*

ABSTRACT

This study was conducted to level up the tolerance of tobacco plant against bialaphos herbicide through tissue culture. The relatively good shoot regeneration from the subcultured calli treated with bialaphos at 0.5 ppm was observed in old the tobacco varieties tested such as NC 82, BY 4 and KA 101. However, at the treatment of bialaphos 1.0 ppm, shoot regeneration was only made in KA 101 variety, showing better regeneration than that of untreated one. When these shoots were transferred to the medium containing of bialaphos 10.0 ppm, the percentage of living shoots (i.e. tolerant plant) was very low, showing 2.43% in NC 82, 2.76% in KA 101 and 0.78% BY 4. Calli were induced and multiplied from leaf petiole of the above tolerant plants even under 2.5ppm of bialaphos, showing an average of 9% in NC 82 and 16% in KA 101 as compared with the untreated control. No calli were induced from tolerant plants as bialaphos concentration increased up to 5.0 ppm. Direct shooting from leaves of the above tolerant plants, that is selected at 10.0ppm of bialaphos treatment, was observed even under 10.0ppm of bialaphos treatment both in NC 82 and in KA 101 varieties, indicating that tolerance of tobacco plants against bialaphos can be greatly increased.

Key words : bialaphos, tolerance, regeneration.

緒 論

최근 除草劑에 對한 作物의 耐性에 關한 研究報告¹⁻¹⁷⁾가 많아졌으며 裴·金等²²⁾은 除草劑 bialaphos를 煙草의 callus에 處理하면 處理區의 ammonia 含量이 8~9倍 增加된다고 報告하였고 이와같은 ammonia 含量의 增大는 glutamine synthetase의 作用 抑制에 依한 것으로 報告된 바 있다.¹⁸⁻²⁰⁾

裴·金等²²⁾은 callus 狀態에서 bialaphos를 處理했을 때 煙草品種間에 相異한 反應을 보였으며 KA 101, Xanthi-Basma와 香草 같은 香喫味種이

他品種에 비해 相對的 耐性을 나타낸다고 報告했다. 이와같은 結果를 토대로 bialaphos를 處理한 培地에서 繼代培養시킨 callus로부터 分化한 shoot에서 담배 耐性個體를 選拔하였고 選拔된 個體의 耐性程度를 bialaphos를 處理한 培地에서의 callus 生長과 direct shoot 및 ammonia 含量으로 檢定하였다.

材料 및 方法

實驗 1. Bialaphos에 대한 煙草의 耐性個體 選拔

* 慶北大學校 農科大學 農學科 Dept. of Agronomy, Coll. of Agriculture, Kyungpook National Univ., Taegu 702-701, Republic of Korea.

Bialaphos 0.5, 0.75, 1.0 ppm 處理區에서 8 個月間 繼代培養된 NC 82, BY4, KA101의 callus 를 다시 IAA 1 μ M, 2-isopentenyl adene 5 μ M, adenine sulfate 50.0 mg/ ℓ 이 添加된 shoot 分化 培地에서 2 個月間 培養 後 分化된 shoot 를 生長 調節劑가 處理되지 않은 MS 培地에 2~3 日間 置床하여 4~5 葉期로 生長시킨 後 繼代培養에 使用된 濃도에 關係없이 正常的인 shoot 만 골라서 bialaphos가 10.0 ppm, 100.0 ppm 添加된 選拔培地에 置床하고 10 日 間隔으로 3 回 繼代培養시켰다. 이때 살아남은 個體를 選拔하여 發根시킨 뒤 2 個月間 溫室條件에서 培養한 後 耐性程度를 檢定하였다.

實驗 2. Bialaphos에 相對的 耐性을 띤 選拔個體의 耐性 再檢定

實驗 1의 Bialaphos 10.0 ppm 이 添加된 培地에서 選拔된 煙草個體에 對한 耐性을 再檢定하기 위하여 溫室에서 8 葉期가 될 때까지 生長시킨 後 葉柄으로부터 callus 를 誘導하여 bialaphos가 2.5, 5.0, 10.0 ppm 이 添加된 callus 增殖培地에 40.0 mg의 callus 를 置床하고 2 個月이 지난 다음 生體重을 測定하여 無處理에 對한 比로 나타냈다.

아울러 耐性을 지닌 상기의 8 葉期の 잎으로부터 direct shooting 되는 程度를 究明키 위하여 BAP (Benzylamino purine) 1.0 mg/ ℓ 이 添加된 培地에서 7 日間 培養 後 bialaphos가 10.0 및 100.0 ppm 處理된 培地에 상기의 잎을 3 切片씩 3 反復으로 置床하고 50 日째에 分化된 shoot 數(direct shoot 數)를 調査하였다.

Ammonia 含量은 bialaphos 10.0 ppm 과 100.0 ppm 處理區에서 枯死한 shoot 生體重 1.0 g 當

Table 1. Number of shoots regenerated from hardening calli of tobacco.¹⁾

Variety	Calli subculture Conc. (ppm)	No. of shoots regenerated			
		Bialaphos			
		0	0.5	0.75	1
NC 82		162	270	290	0 ^{*2)}
BY 4		227	161	44	0*
KA 101		88	82	0*	102

¹⁾ Determined at 90 days after inoculation.

²⁾ *: Calli presented in the form of a moist and friable stage.

ammonia 含量을 Nikolin 과 Butmir²¹⁾의 方法으로 抽出, 發色시켜 spectrophotometer 670 nm에서 測定하였다.

結果 및 考察

除草劑 bialaphos에 대한 煙草耐性個體 選拔: 表 1은 bialaphos가 處理된 培地에서 繼代培養된 callus 를 除草劑가 添加되지 않은 shoot 分化培地에 넣었을 때 1~2 個月 後부터 植物體가 分化되었으며 低濃度の bialaphos 處理 培地에서 繼代培養된 callus로부터는 品種에 關係없이 植物體 分化는 잘 되었고 그중 NC 82 品種에서 많았다. 특히 bialaphos 1.0 ppm 處理區에서 繼代培養된 callus 中에서는 KA 101 品種에서만 shoot 分化가 되었는데 이는 callus의 狀態가 shoot 分化에 影響을 미친 것으로 callus가 딱딱하고 흰색일수록 부드러우며 검은색보다 shoot 分化가 빨리 되었다.

表 2는 bialaphos가 處理된 callus에서 分化된 shoot로부터 bialaphos 10.0 ppm 및 100.0 ppm 處理區에서 耐性을 가진 個體 選拔의 結果로 bialaphos 100.0 ppm을 處理한 培地에서는 供試品

Table 2. Effect of bialaphos on growth of shoots regenerated from hardening calli of tobacco.¹⁾

Variety	Conc. of bialaphos (ppm)	No. of shoots inoculated	No. of shoots tolerated	% ²⁾
NC 82	0	18	18	100
	10	370	9	2.43
	100	348	0	0
BY 4	0	18	17	94.44
	10	255	2	0.78
	100	177	0	0
KA 101	0	18	18	100
	10	145	4	2.76
	100	127	0	0

¹⁾ Determined at 30 days after inoculation. ²⁾ % : rate of shoots tolerated over inoculated shoots.

種 모두가 枯死되었으나 10.0 ppm 處理區에서는 置床한 shoot 數에 의한 生存한 shoot 의 比率이 NC 82에서 2.41%, BY 4에서 0.78%, KA 101에서는 2.76%였다. 이처럼 적은 數이지만 枯死되지 않아 耐性으로 간주되었으며 이들은 뿌리가 分化되지 않은 綠色을 띤 shoot 의 狀態로 生長이 아주 저조하였다.

表 3은 bialaphos가 10.0 및 100.0 ppm이 處理된 培地에서 枯死한 shoot 의 ammonia 含量을 檢定한 것으로 全品種의 平均이 bialaphos가 處理되지 않은 無處理區에서 0.14% 정도인 반면 bialaphos를 10.0 및 100.0 ppm 處理區에서는 2.0% 内外로 無處理에 비해 약 15倍 이상의 ammonia 含量이 檢定되었다. Tachibana, Watanabe, Kaneko¹⁸⁻²⁰⁾ 등에 의하면 bialaphos 處理時 개비름, 강아지풀의 除草效果의 mechanism을 ammonia 蓄積에 의한 것이라고 報告한 바 있다. 따라서 本 實驗에서 얻어진 ammonia 含量의 增加가 glutamine synthetase 의 活性을 抑制하여 植物體를 枯死시키는 原因이 아닌가 思料된다.

表 4는 10.0 ppm의 bialaphos가 處理된 培地에서 살아남은 個體로부터 誘導된 callus 의 生長과 shoot 分化에 미치는 影響을 나타낸 것이며 耐性植物個體(TP: Tolerant Plant)란 bialaphos 10.0 ppm 處理區에서 살아 남은 耐性 煙草植物體를 의미하며 TP 1, 2, 3은 耐性植物 個體番號를 의미한다. Bialaphos 5.0 과 10.0 ppm이 處理된 培地에

Table 3. Ammonia content in dead tobacco shoots affected by bialaphos.¹⁾

Variety	Conc. (ppm)	Bialaphos		
		0	10	100
.....%/g fresh weight				
NC 82		0.138	2.087	2.096
BY 4		0.157	2.070	1.908
KA 101		0.125	1.788	1.890

¹⁾ Tobacco shoots used were regenerated from hardening calli.

²⁾ Determined at 30 days after inoculated.

³⁾ Dead shoots showed yellow color.

서는 callus의 誘導 및 生長이 되지 않았으나 2.5 ppm 處理區에서는 NC 82의 TP와 KA 101의 TP는 共に 無處理個體에 못지 않게 callus의 誘導나 生長이 良好하였으며 KA 101의 TP쪽이 NC 82의 TP보다 callus의 生長이 良好한 것 같다. 襄·金²²⁾은 bialaphos 處理時에 他品種보다 KA 101에서 callus의 生長이 良好했다는 것과 本 結果와 같은 맥락에서 理解가 가능하다.

한편 NC 82의 TP와 KA 101의 TP의 葉切片으로부터 bialaphos를 10.0 및 100.0 ppm 處理한 分化培地에서 direct shooting 시킨 結果 無處理區에서는 많은 shoot가 形成되었으나 bialaphos 10.0 ppm에서는 耐性 葉切片의 個體에 따라 direct shooting된 數는 相異하였다(表 4). 特히 callus의 誘導 및 生長이 良好한 個體로부터 direct shooting이 잘 되었으며 煙草品種 NC 82의 TP 1

Table 4. Effect of bialaphos on the calli growth and direct shoot formation from tolerant plant under treatment of 10ppm bialaphos.

Variety	TP ¹⁾	Bialaphos Conc. (ppm)	Rate of calli growth				No. of direct shoot formation ²⁾		
			0	2.5	5	10	0	10	100
.....% ³⁾									
NC 82	TP 1		100	15	**)	.	MS ⁵⁾	11	.
	TP 2		100	7	.	.	MS	.	.
	TP 3		100	5	.	.	MS	2	.
	Control ⁶⁾		100	7	.	.	MS	.	.
KA 101	TP 1		100	18	.	.	MS	5	.
	TP 2		100	14	.	.	MS	.	.
	Control		100	12	.	.	MS	.	.

¹⁾ TP: Tolerant plant, 1, 2 and 3 indicate individual tolerant plant.

²⁾ Direct shooting was attempted from leaf disc selected under 10ppm bialaphos treatment.

³⁾ %: the ratio of bialaphos treated over bialaphos untreated.

⁴⁾ *: Negligible growth, but not counted.

⁵⁾ MS: Multiple shoot.

⁶⁾ Control: Tobacco shoots which was not treated with bialaphos.

이나 KA 101의 TP 1으로부터 각 11 및 5개의 direct shoot가 形成되었다(表 4). Owens 등²³⁾에 의하여 煙草의 kanamycin 耐性個體로부터 誘導된 callus의 生長은 選拔個體中 kan 7個體에서 가장 높게 나타났고 植物體 分化時 無處理地에서는 비슷한 率로 이루어졌으나 kanamycin이 40 μ M 添加된 選拔地에서는 kan 7個體가 높은 率로 分化되었다고 報告하였으며 Singer 등⁸⁾은 除草劑 amitrole에 對한 耐性煙草 callus에서 分化된 植物體에 amitrole을 處理時 callus의 生長 및 植物體의 耐性程度는 選拔 line 모두 amitrole에 對해 耐性을 보이는 것이 아니고 9-subclone에서 分化된 植物體만이 耐性을 보인다고 報告한 것과 本實驗의 結果는 類似하지 않나 思料된다.

以上の 結果를 綜合해 보면 除草劑 bialaphose 10.0 ppm 處理區에서 살아 남아서 耐性으로 간주했던 모든 個體에서는 동일한 反應을 보이는 것이 아니라 각 個體間에 相異했으며 bialaphos 處理時에 callus 誘導 및 生長이 잘 되는 個體에서 direct shooting도 잘 되어 耐性이 特定選拔個體에서만 나타낸다고 볼 수 있다.

Bialaphos 1.0 ppm에서 感受性을 나타내던 煙草로부터 bialaphos 10.0 ppm 處理區에서 生存 가능한 植物體를 얻을 수 있어서 耐性의 程度를 크게 增大시킬 수 있었다고 思料된다. 非選擇性 除草劑에 對한 耐性의 增大는 쉽지 않으나 本實驗에서 시도한 方法으로 推進한다면 特定除草劑에 耐性을 지닌 植物體를 만들 수 있을 것으로 思料되며 이 分野의 더 많은 研究가 要望된다.

摘 要

除草劑 bialaphos 處理에서 살아남은 個體로부터 다시 bialaphos가 處理된 培地에서 callus의 誘導, 生長 및 direct shooting, ammonia 含量 등으로 耐性을 再檢定하여 얻어진 약간의 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Bialaphos가 0.5~0.75 ppm의 低濃度로 處理된 培地에서 生長한 callus로부터 分化된 植物體 數는 品種에 관계없이 分化가 잘 되었으나 1.0 ppm 處理區에서 繼代培養된 것 가운데서는 KA 101만이 分化되었다.

2. 分化植物體 가운데 bialaphos에 耐性인 個體를 再選拔하기 위해 bialaphos 100.0 ppm 處理區

에 置床時 모두 枯死하였으며 bialaphos 10.0 ppm 處理區에서는 NC 82 品種 2.43%, KA 101 2.76%, BY 4 0.78%가 살아남아 品種間에 다소 差異가 있었다.

3. Bialaphos 10.0 및 100.0 ppm의 處理區에서 枯死한 shoot에 含有된 ammonia 含量은 無處理區보다 약 15倍 程度 높아 shoot의 枯死原因이 ammonia 蓄積에 의한 것임을 立證할 수 있었다.

4. NC 82 品種의 TP 1(耐性植物體) 個體가 非選拔個體보다 bialaphos가 2.5 ppm 添加된 callus 增殖培地에서 callus 增殖率이 2.14 배나 높았고, bialaphos가 10.0 ppm 添加된 shoot 分化培地에서는 사례當 11個體의 shoot를 分化시켜 다른 個體보다 耐性이 컸다.

引 用 文 獻

1. Larkin, J.J. and W.R. Scoweroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, Theor. Appl. Genet. 197-214.
2. Chaleff, R.S. and M.F. Parsons: Direct selection in vitro for herbicide resistant mutants of *Nicotiana tabacum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 5104-5107.
3. Chaleff, R.S. 1981. Genetics of higher plants. Cambridge Univ. Press., New York. 184.
4. Chaleff, R.S.. 1980. Further characterization of picloramtolerant Mutants of *Nicotiana tabacum*. Theor. Appl. Genet. 58: 91-95.
5. Chaleff, R.S. and R.B. Ray. 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. Science. 223: 1148-1151.
6. Chaleff, R.S. and C.J. Mauvais. 1984. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. Science. 224: 1443-1444.
7. Loo Shin-wei., Hochue-pui et. al. 1981. 4-oxalysine-resistant mutant from tobacco callus. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. 225-263.
8. 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.
9. David, N.R. and C.S. Peter. 1978. Herbicide-tolerant tobacco mutants selected in site and recovered via regeneration from cell culture. *Genet. Res. Camb.*, 32 : 85-89.
 10. Arthur, L.L., Berlyn, M.B. et.al.. 1980. Isolation and characterization of glycine hydroxamate-resistant cell lines of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 66 : 334-341.
 11. Peter, S.C.. 1973. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science*. 180 : 1366-1368.
 12. Susan, R.S. 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.
 13. Honzawa, S., Matsuba, K. et.al. 1987. Comparative studies between glyphosate-adapted and non-adapted carrot-cells in tissue culture. *Weed Research, Japan.*, 32 : 18-24.
 14. 畑信吾. 1987. 植物の除草剤抵抗性機構. 植物の化學調節, 日本 22(1) : 27-36.
 15. Ellis, B.E. 1978. Non-differential sensitivity to the herbicide metribuzin in tomato cell suspension cultures. *Can. J. Plant Sci.* 58 : 775-778.
 16. 金吉雄. 1986. 植物의 細胞培養을 통한 農藥開發, 慶北大學校 40周年 紀念, 特集號, 201-216.
 17. Furesawa, I., K. Tanaka, P. Thanutong, A. Mizuguchi, M. Yazaki, and K. Asada. 1984. Paraquat resistant tobacco calluses with enhanced superoxide dismutase activity. *Plant & Cell Physiol.* 25 : 1247-1254.
 18. Tachibana, K., T. Watanabe et.al. 1987. Inhibition of glutamine synthetase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialaphos treated japanese barnyard millet. *J. Pesticide Sci. LL*, 27-31.
 19. Tachibana, K., T. Watanabe et.al. 1987. Accumulation of ammonia in plants tested with bialaphos. *J. Pesticide Sci.* 33-37.
 20. Tachibana, K. and K. Kaneko. 1986. Development of a new herbicide bialaphos. *J. Pesticide Sci.* 11 : 297-304.
 21. Nikolin, B.A. and H. Butmil. 1974. Colorimetric determination of ammonia in tobacco. *Tob. Sci.* 18 : 10.
 22. 裴允珠·金吉雄·鄭享鎮. 1987. 담배의 組織培養과 除草劑 耐性, 韓國雜草學會誌 第7卷 別冊1號 : 48-49.
 23. Lowell D. Oweus. 1981. Characterization of Kanamycin-Resistant Cell lines of *Nicotiana tabacum*. *plant physiol.* 67 : 1166-1168.