

잎담배 Alkaloid 분석에 관한 연구

장기철, 한상빈, 김용욱, 이운철

한국인삼연초연구소 분석센터

Studies on the Analysis of Tobacco Leaf Alkaloids

G. C. Jang, S. B. Han, Y. O. Kim and U. C. Lee

Chemical Analysis Center, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

ABSTRACT

This study was carried out to develop the method of alkaloids analysis and investigate the kinds and contents of alkaloids in flue-cured, burley and oriental tobacco leaves using developed analytical method.

The developed analytical method of alkaloids was as followed : Tobacco sample was treated with acid(pH 2~3) and extracted with chloroform to remove chemical components except alkaloids. Sample solution was treated with alkali(pH 12~13) and was extracted with chloroform to obtain alkaloids from sample solution. After extraction of alkaloids from tobacco leaves, alkaloids were separated and identified by GC, GC/MS using SE-54 fused silica capillary column.

Nicotine, nornicotine, myosmine, β -nicotyline, anabasine, anatabine, 2, 3-bipyridyl, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine and formyl anatabine were isolated and identified from the extracts of tobacco leaves.

The contents of alkaloids were burley > flue-cured > oriental tobacco leaves, but oriental tobacco leaves were higher nornicotine, cotinine, formyl nornicotine and acetyl nornicotine contents than those of flue-cured tobacco leaves.

The burley tobacco harvested in Korea was higher nornicotine contents by 2~6 times in the portions of cutter, leaf and tips position than that of burley tobacco(B₃F) harvested in U. S. A.

서 론

담배 알칼로이드는 담배 특징을 나타내는 가장

중요한 성분으로 담배 맛에 큰 영향을 미친다¹⁾.
담배 알칼로이드 중 가장 함량이 높은 니코틴은
대부분 뿌리에서 합성되나, 니코틴을 제외한 알

칼로이드는 줄기, 잎 등의 지상부에서 합성된다²⁾. 담배 알칼로이드의 유전자상은 총 알칼로이드 함량을 결정하는 유전자군과 니코틴을 노르니코틴으로 전환하는데 관여하는 유전자군에 의해 지배되며³⁾, 알칼로이드 함량은 품종, 재배환경, 재배조건 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있다^{2,4)}. 담배 알칼로이드 중 함량이 가장 높은 니코틴은 직접 자극성을 나타내며 연기의 pH에 따라 감지 정도가 달라져 니코틴 단독으로 연기의 향 특성을 지배하지 않는 것으로 알려져 있다^{2,4)}.

지금까지 잎담배에서 밝혀진 알칼로이드 화합물은 니코틴, 노르니코틴, anabesine이 95% 이상을 차지하며 그 이외에 myosmine, anatabine, 노르티코틴계열화합물, anatabine계열화합물 등이 미량으로 존재하는 것으로 알려져 있다⁵⁻¹¹⁾.

잎담배중 알칼로이드 분석 방법은 Loise 등¹²⁾은 알칼리로, Lyerly 등¹³⁾은 산, 알칼리로 추출하여 용매로 이행시켜 기체 크로마토그래프를 사용하여 분석하는 방법이 알려져 있다. 또한 Matsushima 등¹⁴⁾은 적은양의 시료를 용매로 추출하여 NP-FID같은 질소화합물을 선택적으로 검출하는 검출기를 사용하여 분석하는 방법 등이 알려져 있다. 그러나 우리나라의 경우는 전 알칼로이드, 니코틴은 많이 분석되어 있으나, 그외의 나머지 알칼로이드 분석 방법에 대한 연구는 미미한 성질이다.

그러므로 본 연구에서는 메틸 알코올-속슬레 추출장치 및 산 알칼리 처리에 의해 잎담배중 니코틴, 노르니코틴, anabesine 이외에 미량으로 존재하는 알칼로이드 성분을 분리확인할 수 있는 분석방법으로 검토하고, 몇가지 품종 잎담배의 알칼로이드 함량을 조사하였다. 또한 추출방법은 재현성이 좋고 간편하게 분석하기 위한 방법을 찾기 위해 적은 양의 시료를 산, 알칼리 처리 및 알칼리 처리의 두가지 추출방법을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

1. 잎담배 시료와 알칼로이드의 추출 및 분리

잎담배 시료는 국내 업체에 많이 사용되는 한국산

황색종, 버얼리종은 후엽 3등을, 미국산 황색종, 버얼리종은 B₃F를, 오리엔트종은 이즈미르, 바스마를 각각 취하여 담배성분분석법¹⁵⁾에 따라 시료를 조제하였다.

알칼로이드의 추출은 시료 20g을 속슬레 추출장치에 넣고 메틸알코올 150ml를 가해 16시간 동안 추출하였다. 메틸알코올 추출물을 여과하여 감압농축기(50°C, 10torr)로 농축한 후 2N 염산용액을 가해 pH를 2~3으로 조정된 다음, 클로로포름 100ml를 가해 3회 추출하여 알칼로이드 이외의 성분을 제거하였다. 다시 물층을 5N 수산화나트륨 용액을 가해 pH를 12~13으로 조절하고, 내부 표준물질로 0.01% dodecane 클로로포름 용액 10ml를 가하고, 클로로포름으로 알칼로이드를 추출하였다. 클로로포름층을 감압농축기로 완전 농축시키고, 농축된 시료에 클로로포름을 가해 10ml능금 플라스크에 표선까지 채운후 GC 및 GC/MS분석용 시료로 사용하였다.

2. GC 및 GC/MS에 의한 알칼로이드의 분리 및 확인

알칼로이드의 분리는 HP 5890A GC를 사용하였으며 분리관은 SE-54 fused silica capillary column (30m × 0.25mm ID), 운반기체인 질소의 유속은 1 ml/min, 주입구 및 검출기(FID) 온도는 각각 250°C, 분리관 온도는 130°C에서 5분간 유지하고, 5°C/min로 250°C까지 상승시키고, 250°C에서 60분간 유지하는 조건으로 시료 3 μ l를 split mode로 주입하였다. GC/MS에 의한 알칼로이드의 분리 및 확인은 Varian MAT 212 system 및 SS MAT 188 data system을 사용하였으며, GC/MS 조건은 ion source로 EI 70eV, ion source 압력은 1.3 × 10⁻⁵ torr, ion source 온도는 220°C이었다.

3. 추출방법의 비교

1) 알칼리 처리

담배시료 2g에 물 15ml, 10% 수산화나트륨 용액 10ml, 내부 표준물질로 0.01% dodecane 클로로포름 용액 2ml를 넣고, 클로로포름 50ml를 가하여 10분간 진탕한다. 진탕액을 분액 깔때기에

옮기고 클로로포름층 25ml를 분취하여 감압농축기로 완전 농축하고 농축된 시료에 클로로포름 1ml를 가하여 GC 및 GC/MS분석용 시료로 사용하였다.

2) 산, 알칼리 처리

담배시료 2g에 물 25ml를 가하고 2N 염산용액으로 pH를 2~3으로 조정한다 다음 클로로포름 100 ml를 가해 3회 추출하여 알칼로이드 이외의 성분을 제거하였다. 물층을 정확히 절반을 취하여 5N 수산화나트륨 용액으로 pH를 12~13으로 조절하고 내부 표준물질로 0.01% dodecane 클로로포름 용액 1ml를 가한 후, 클로로포름 50ml를 3회 가해 알칼로이드를 추출하였다. 클로로포름층을 감압농축기로 완전 농축시키고 농축된 시료에 클로로포름 1 ml를 가해 GC 및 GC/MS분석용 시료로 사용하였다.

4. GC에 의한 잎담배 중 알칼로이드의 정량

GC에 의한 잎담배 중 알칼로이드의 정량은 표준품이 있는 니코틴, anabasine은 내부 표준법에 의해 정량하였으며 나머지 알칼로이드는 각 성분의 봉우리 넓이를 내부 표준물질의 봉우리 넓이로 나누어 그 비로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. GC 및 GC/MS에 의한 잎담배 중 알칼로이드의 분리 및 확인

기체 크로마토그래프에 의한 잎담배중 알칼로이드를 분리한 기체 크로마토그램은 그림 1과 같았다. 그림 1에 나타낸 바와 같이 SE-54 fused silica capil-

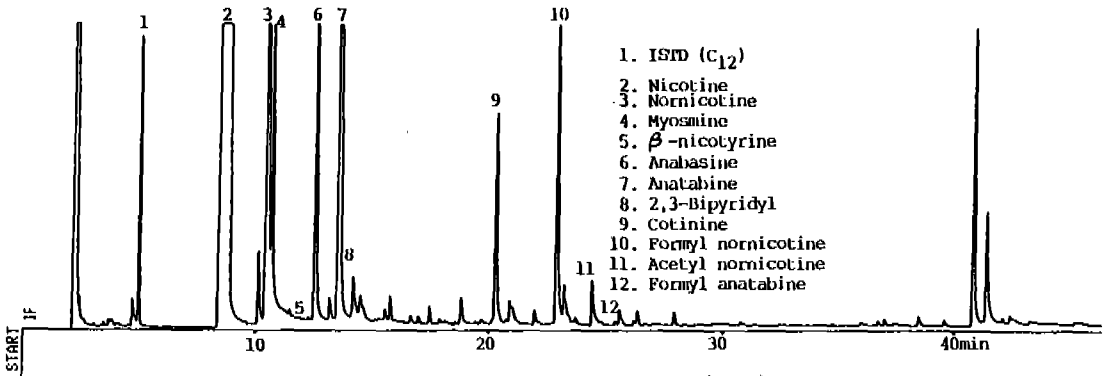


Fig. 1 GC Chromatogram of Alkaloids from Burley(USA) Tobacco.

lary 분리관에 의해 많은 성분들은 분리할 수 있었다.

기체 크로마토그래프에 의해 분리된 각 봉우리 성분을 확인하기 위하여 시료를 기체 크로마토그래프-질량분석기에 주입하여 각 봉우리 성분의 질량 스펙트럼을 얻었다. 이중 분자량이 146인 질량스펙트럼을 그림 2에 나타내었다. 이 질량 스펙트럼은 EPA/NIH mass spectral data base¹⁶⁾에 수록된 노르니코틴의 질량 스펙트럼과 토막이온이 정확히 일치하였으며, 분자량이 146으로 이 화합물은 노르니코틴임을 확인할 수 있었다.

이와 같이 질량스펙트럼에서 분자량, 토막이온의

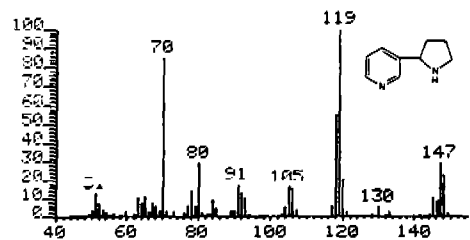


Fig. 2 Mass Spectrum of Nornicotine from Burley (USA) Tobacco.

질량과 그 존재비(relative abundance) 및 여러 연구자의 연구결과⁵⁻¹¹⁾등으로부터 그림 1에 나타난 바와 같이 니코틴, 노르니코틴, myosmine, beta-nico-

tyrine, anabasine, anatabine, 2,3-bipyridyl, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine, formyl anatabine 등을 분리 확인할 수 있었다.

본 연구에서 분리 확인한 알칼로이드 이외에 여러 연구자들⁵⁻¹¹⁾의 보고와 같이 노르니코틴계, anatabine계 등 약 20개 정도가 더 알려져 있어 이들 성분에 대하여는 추후에 분리 확인코져 한다.

2. 추출방법간의 비교

담배중 알칼로이드를 메틸 알코올-속슬레 장치를 이용하여 추출하고 산, 알칼리로 처리하여 추출하는 방법은 많은 양의 시료와 추출시간이 오래 걸려 많은 시료를 처리하는데는 어려움이 있다. 그러므로 시료의 양을 줄이고 추출시간을 단축하여 빠른 시간내에 많은 시료를 분석하기 위하여 알칼리 및 산, 알칼리 처리의 2가지 추출방법을 비교 검

토하였다.

2가지 추출방법에 따라 비교한 기체 크로마토그램을 그림 3에 나타내었다. 그림 3에 나타난 바와 같이 시료에 산, 알칼리로 알칼로이드를 추출한 시료가 알칼로이드 성분만 선택적으로 나오는 것을 알 수 있었다. 그러나 시료에 알칼리 단독으로 알칼로이드를 추출한 방법은 알칼로이드 이외의 다른 성분들이 많이 나와 기체 크로마토그램이 복잡하고 또한 머무른 시간이 30분 이후에도 계속 봉우리가 나오는 현상을 볼 수 있었다.

따라서 2가지 추출 방법 중 시료에 산 처리 후 클로로포름으로 알칼로이드 이외의 성분을 제거하고, 다시 물층을 알칼리화하여 클로로포름으로 알칼로이드를 추출하여 분석하는 방법이, 알칼리만으로 처리하는 방법보다 시료 전처리 과정이 다소 복잡하고 시간이 많이 걸리나, 알칼로이드 성분만

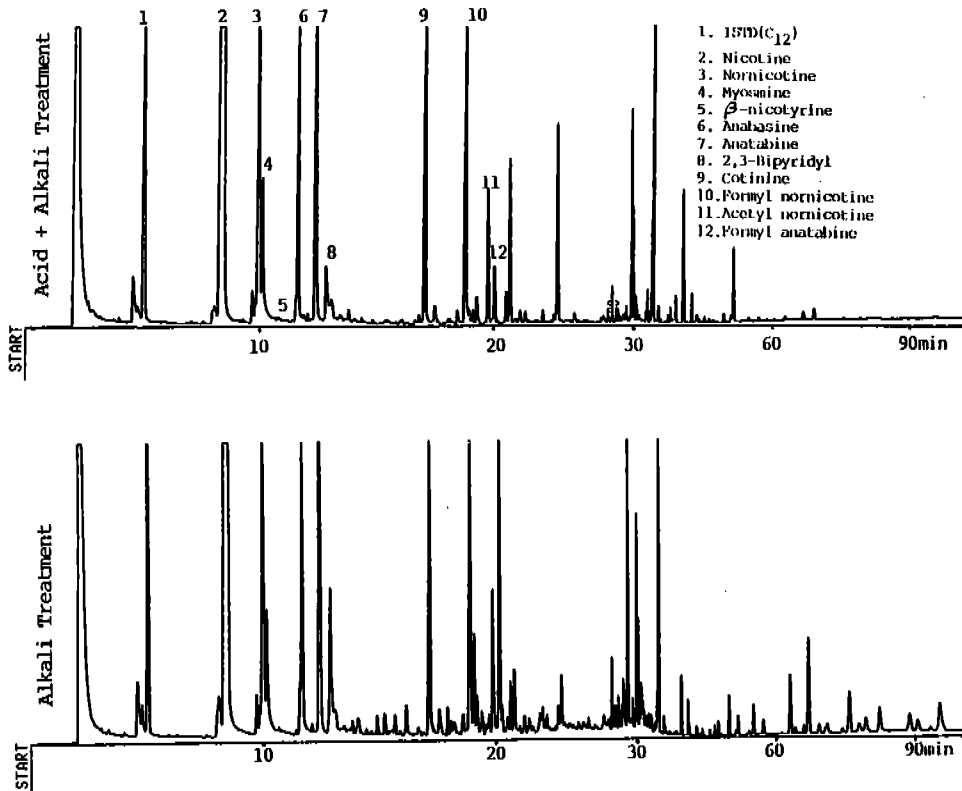


Fig. 3 Comparison of GC Chromatogram between Separation Method of Alkaloids from Burley(USA) Tobacco.

선택적으로 분리할 수 있기 때문에 오히려 분석시간을 단축할 수 있고 분석결과와 해석에도 유리한 것으로 사료된다.

3. 잎담배 중 알칼로이드의 분석

메틸 알코올-속슬레 추출 및 산, 알칼리 처리에 의해 잎담배중 니코틴과 anabasin의 품종별 함량을 조사한 것을 표 1에 나타내었다. 품종별로는 니코틴, anabasin 함량은 다소 차이가 있으나 대체로 버얼리종 > 황색종 > 오리엔트종 순으로 나타나 Verne 등^{17,18)}의 보고와 비슷하였다.

니코틴과 anabasin 이외의 알칼로이드 화합물은 표준품의 구입이 어려워 기체 크로마토그램상에 나타난 각 성분의 봉우리 넓이를 내부 표준물질(dodecane)의 봉우리 넓이로 나누어 상대적 비율로 각 성분들을 비교하여 표 2에 나타내었다.

품종간 알칼로이드 함량은 버얼리종 > 황색종 > 오리엔트종 순이었으나, 오리엔트종은 황색종에 비해 노르니코틴, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine 함량은 오히려 높게 나타났다.

품종별 알칼로이드의 상대비는 황색종은 니코틴 > anatabine > 노르니코틴 > anabasin 순이었고,

Table 1. Composition of Alkaloids from cured leaves

Component	Flue-cured		Burley		Orient	
	Korea	U. S. A.	Korea	U. S. A.	Izmir	Basma
	----- (ug/g) -----					
Nicotine	11975	15480	25422	34205	9038	14227
Anabasin	141	201	287	319	30	109

Table 2. Relative composition of Alkaloids from cured leave

Component	Flue-cured		Burley		Orient	
	Korea	U. S. A.	Korea	U. S. A.	Izmir	Basma
	----- (Peak area/ISTD area) -----					
Nicotine	208.650	269.740	442.967	596.002	157.483	247.902
Nornicotine	0.578	2.314	59.446	12.251	5.684	9.962
Myosmine	0.502	0.855	2.583	1.330	1.736	0.430
Anabasin	1.407	1.995	2.855	3.175	0.298	1.080
Anatabine	6.107	6.764	16.828	17.733	1.738	4.695
2, 3-Bipyridyl	0.350	0.280	0.438	0.467	0.099	0.246
Cotinine	—	0.215	0.986	1.309	0.603	0.595
Formyl nornicotine	0.174	0.745	3.835	2.264	1.171	1.189
Acetyl nornicotine	—	0.130	0.867	0.405	0.267	0.281
Formyl anatabine	—	0.244	0.087	0.127	—	0.076

버얼리종과 오리엔트종은 니코틴 > 노르니코틴 > anatabine 순으로 나타났다. 지금까지 알칼로이드의 주요 화합물은 니코틴, 노르니코틴, anabasine이 주성분⁵⁻¹¹⁾으로 알려져 있으나, 본 연구에서는 anatabine이 품종에 따라서는 노르니코틴 또는 anabasine에 비해 상대적 비율이 높게 나타난 것과 알칼로이드 절대 함량이 낮은 오리엔트종이 황색종에 비해 cotinine과 노르니코틴 계열 화합물의 함량이 높은 점등은 앞으로 시료수를 많이하여 좀더 규명되어야 할 것으로 고찰된다.

품종별 알칼로이드 함량을 한, 미간 상대적 비율로 비교해 보면 버얼리종, 황색종 모두 니코틴 함량이 미국산이 한국산에 비해 높은 것으로 나타났다. 버얼리종의 노르니코틴 함량은 한국산이 미국산에 비하여 높은 것으로 나타났다.

엽분별 알칼로이드 함량은 하엽에서 상엽으로 갈수록 함량이 높아지는 결과를 나타내었고 그 함량은 표 3에 나타났다. 노르니코틴은 미국산 B₃F를 기준으로 볼 때 한국산은 중엽 이상에서 함량이 현저히 높아지는 것으로 나타났다.

Table 3. Relative composition of Alkaloids followed by Stalk Position of Burley Tobacco

Component	Korea				U. S. A.
	Lugs	Cutter	Leaf	Tips	B ₃ F
	----- (Peak area/ISTD area) -----				
Nicotine	108.052	211.015	481.236	510.046	496.825
Nornicotine	3.537	26.483	52.788	74.971	16.114
Myosmine	0.997	1.084	1.705	2.603	0.875
Anabasine	0.539	1.109	2.796	3.393	2.758
Anatabine	4.291	10.738	21.697	23.645	16.041
2, 3-Bipyridyl	0.220	0.236	0.243	0.257	0.207
Cotinine	0.530	0.423	0.442	0.541	0.560
Formyl nornicotine	0.751	1.373	1.630	2.168	1.229
Acetyl nornicotine	0.149	0.214	0.262	0.305	0.220
Formyl anatabine	0.062	0.058	0.072	0.079	0.078

이상의 결과에서 버얼리종은 한국산이 미국산에 비해 노르니코틴 함량이 현저히 높아지는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 니코틴을 노르니코틴으로 변화시키는 우성 유전자의 돌연 변이율이 일세대마다 0.8%라는 보고^{4, 10)}와 연관하여 볼때, 우리나라 버얼리종 종자퇴화 또는 재배환경 및 재배방법 등의 차이에 기인하는 것인지는 앞으로 더 많은 연구를 통하여 규명되어야 할 것으로 보인다.

결 론

담배 알칼로이드 화합물 중 미량성분을 분석할 수 있는 분석방법을 검토하고, 이 방법에 따라 한국산 및 미국산 황색종, 버얼리종과 이즈미르, 바스마에 대한 알칼로이드 화합물 종류와 함량을 조사한 결과는 아래와 같다.

1. GC 및 GC/MS(SE-54 fused silica capillary column)로 잎담배 중에서 니코틴, 노르니코틴,

- myosmine, β -nicotryline, anabasine, anatabine, 2, 3-bipyridyl, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine, formyl anatabine 등 11종의 알칼로이드 화합물을 분리 확인하였다.
2. 알칼로이드 분석방법은 시료에 산 처리(pH 2-3)를 하여 클로로포름으로 불순물을 제거하고 알칼리 처리(pH 12-13)를 하여 클로로포름으로 알칼로이드를 추출하여 분석하는 방법이 바람직할 것으로 보인다.
 3. 알칼로이드 화합물 함량은 대부분 버얼리종이 가장 높고 황색종, 오리엔트종 순이었으나, 오리엔트종은 황색종에 비해 노르니코틴, cotinine, formyl nornicotine, acetyl nornicotine 함량이 높을 것으로 추정된다.
 4. 한국산 버얼리종은 미국산 버얼리종(B₃F)에 비해 중엽, 본엽, 상엽의 노르니코틴 함량이 2~6배 정도 높을 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Jeffrey R. N., *Tob. Sci.*, 3, 89-93(1959)
2. Akehurst B. C., *Tobacco*, 2th ed., Longman, London & New York, p 78-650(1981)
3. Mann T. J., J. A. Weybrew, D. F. Matzinger and J. L. Hall, *Crop Sci.*, 4, 349-353 (1964)
4. 한국연초학회, 담배과학총설, p 26-32(1987)
5. Kisaki T., S. Mizusaki and E. Tamaki, *Phytochemistry*, 7, 323-327(1968)
6. Bolt A. J. N., *Phytochemistry*, 11, 2341-2343(1972)
7. Warfield A. H., W. D. Galloway and A. G. Kallianos, *Phytochemistry*, 11, 3371-3375 (1972)
8. Miyano M., H. Matsushita, N. Yasumatsu and K. Nishida, *Agric. Biol. Chem.*, 43(10), 2205-2206(1979)
9. Matsushita H., Y. Tsujino, D. Yoshida, A. Saito, T. Kisaki, K. Kato and M. Noguchi, *Agric. Biol. Chem.*, 43(1), 193-194(1979)
10. Miyano M., H. Matsushita, N. Yasumamatsu and K. Nishida, *Agric. Biol. Chem.*, 43(7), 1607-1608(1979)
11. *ibid*, 45(5), 1029-1032(1981)
12. Louis D. Q. and A. P. Nicholas, *Agric. and Food Chem.*, 10(1), 79-82(1962)
13. Lyrly L. A. and G. H. Greene, *Beitr. Tabakforsch.*, 8(6), 359-361(1976)
14. Matsushima S., T. Ohsumi and S. Sugawara, *Agric. Biol. Chem.*, 47(3), 507-510(1983)
15. 김찬호 외, 담배성분분석법, 한국인삼연초연구소, 18-19(1991)
16. Heller S. R. and G. W. A. Milne, EPA/NIH Mass Spectral Data Base, US Government Printing Office, WASHINGTON, D. C., Vol. 1-4(1978)
17. Verne A. S. and J. A. Saunders, *Tob. Sci.*, 26, 117-120(1982)
18. Andersen R. A., P. D. Fleming, H. R. Hamilton-Kemp, D. F. Hildebrand and T. G. Sutton, *Tob. Sci.*, 34, 50-56(1990)
19. Wernsman E. A. and D. F. Matzinger, *Tob. Sci.*, 14, 34(1970)

단백질 분해효소억제제를 이용한 담배의 품질평가

손형욱, 임홍빈, 이영구, 이동욱, 김용태

한국인삼연초연구소 화학부

Evaluation of Cigarette Quality by Use of α_1 -Protease Inhibitor

H. O. Sohn, H. B. Lim, Y. G. Lee, D. W. Lee and Y. T. Kim

Division of Chemical Research, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

ABSTRACT

Current studies indicated that emphysema in smokers might be due, in part, to the local suppression of α_1 -protease inhibitor(α_1 -PI) in lung by reactive oxygen species in cigarette smoke or smoke-activated lung neutrophils.

In the present works, we examined the possibility that a measure which inactivated α_1 -PI by cigarette smoke could be an alternative method to evaluate the cigarette quality. In order to determine the inactivation of α_1 -PI, trypsin inhibitory capacity(TIC) was assayed. A rapid loss of α_1 -PI activity occurred when α_1 -PI solutions was exposed the gas phase or total particulate matter(TPM) obtained from various brands. The inactivation of α_1 -PI by gas phase was dependent upon the number of puffs and the age of the smoke. However, that by TPM was rather decreased since 2 puffs and also showed no more change over 24hrs after exposing. Inactivation of α_1 -PI determined by our suggested method(5 puffs, 24hours of aging after exposing) using various commercial cigarettes exhibited that high tar brands has inactivated it more strongly than low tar cigarettes. But the ability of some brands to inactivate α_1 -PI does not correlate with the content of tar or nicotine.

These results suggest that the degree of α_1 -PI inactivation by cigarette smoke may be a useful index for the evaluation of cigarette quality and that it should be also contribute to the manufacture of less hazardous cigarettes.

서론

담배는 남녀노소 및 종족에 관계없이 전인류가

애호하는 공통적인 기호품이다. 기술의 발달과 더불어 다양한 욕구의 변화에 따라 수많은 종류의 담배가 개발되고 있으며 특히 기능성 담배의 개발은

담배산업의 새로운 전망을 보이고 있다. 이러한 다양화에 따라 담배의 품질평가에 있어서도 고유의 특성을 정확히 비교, 평가할 수 있는 새로운 방법이 요구된다.

또한 담배 연기는 CO, benzopyrene 등 유해화합물 이외에도 아직까지 밝혀지지 않은 많은 성분들로 구성된 복잡한 물질이다. 따라서 담배의 품질을 비교함에 있어 단지 이들 단일 성분들만의 분석으로 평가한다는 것은 오류를 범할 수가 있으므로 전연기성분이 생체에 미치는 영향을 평가할 수 있는 생물학적 분석방법의 도입이 절실히 요구된다.

흡연으로 인하여 생체가 손상을 받기 가장 쉬운 부위는 폐와 기도이며 특히 흡연으로 인한 폐기종은 생체내 단백질 분해효소억제제(α_1 -PI)가 활성산소에 의해 불활성화 되기 때문이라고 보고된 바 있다¹⁾. 즉 담배연기에 의해 활성화된 다형질핵 백혈구와 폐포의 대식세포로부터 superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 활성산소종이 생성되며 이들에 의해 단백질분해효소억제제가 불활성화되어²⁻⁴⁾ 단백질분해효소와의 평형이 깨어지게 되고 상대적으로 활성이 증가된 단백질 분해효소에 의해 폐가 손상을 입게 된다⁵⁾. 이외에도 담배연기중의 NO나 ubiquinone과 같은 화합물에 의해서도 직접 활성산소가 생성될 수 있기 때문에^{6,7)} 연기에 의한 단백질 분해효소 억제제의 활성억제는 전연기성분이 생체에 미치는 영향을 평가할 수 있는 좋은 지표가 될 수 있다.

본 연구실에서는 이미 담배연기중에 활성산소종들의 생성을 확인하였으며 이는 담배의 종류에 따라 그 정도가 각기 다르게 나타났다⁸⁾. 따라서 담배연기에 의한 α_1 -PI의 불활성화 정도를 측정하여 담배품질 평가 방법으로 활용할 수 있는 생물학적 분석방법을 정립하고자 이 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 시료

시판중인 국산 및 외산 담배와 본 연구소에서

제조한 시제품 담배를 상대습도 57%에서 48시간 이상 조화시켜 시료로 사용하였다.

2) 시약 및 기기

α_1 -protease inhibitor(α_1 -PI), Na-Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide(BAPNA), trypsin, triethanolamine, glutathione, catalase, SOD 등은 Sigma chemical company에서 구입하여 사용하였으며 기타 다른 시약은 특급을 사용하였다.

담배연소를 위해 자동직연장치(Heinr, Borg-walt, RM, 1/G, West Germany)를 사용하였으며 효소의 활성도 측정을 위하여 Varian사의 Carry 17D spectrophotometer를 사용하였다.

2. 실험방법

본 실험에 사용된 모든 담배는 자동직연장치를 이용하여 CORESTA 표준조건에 따라 연소시키고 whole smoke와 기체상은 α_1 -PI가 함유된 buffer 용액(0.025mg/ml, ice cold 0.2M triethanolamine buffer, pH 7.8) 10ml에 직접 포집하였으며 전연기응축물(TPM)은 cambridge filter에 포집한 후 α_1 -PI용액 10ml에 담그어 sonication 후 여과하여 실온에 보관하면서 시료로 사용하였다.

Trypsin 활성도는 Witt 등⁹⁾의 방법에 따라 pH 8.2에서 측정하였는데, native α_1 -PI용액 및 담배연기를 포집한 α_1 -PI용액 1.8ml에 trypsin용액(0.25mg/ml of 0.001N HCl) 200 μ l를 첨가하여 37°C에서 5분간 incubation한 다음 BAPNA용액(1mg/ml) 1ml와 반응시켜 405nm에서 5분간 흡광도변화를 측정하였다.

이때 trypsin inhibitory capacity(TIC)는 native α_1 -PI와 시료의 trypsin 활성도의 차이를 가지고 계산하였으며 native α_1 -PI의 TIC를 100%로 취하였다.

결 과

1. 담배연기에 의한 α_1 -PI의 불활성화

그림 1에서처럼 puff수가 증가함에 따라 gas phase에서는 α_1 -PI의 활성이 감소되어 한개피 연소시 70%까지 불활성화되었으며 이는 비교적

puff수와 정량적인 관계를 보였다. TPM의 경우 gas phase와는 달리 초기 1, 2 puff에서 α_1 -PI가 70% 정도 불활성화되나 4 puff 이상에서는 오히려 α_1 -PI의 활성이 증가되어 50% 정도의 일정수준을 유지하였다. 한편 whole smoke의 경우 puff수가 증가함에 따라 α_1 -PI의 불활성화도 증가되다가 5 puff이상에서는 거의 일정한 수준을 유지하였으며 그 정도는 gas phase에 의한 것보다 훨씬 적었다.

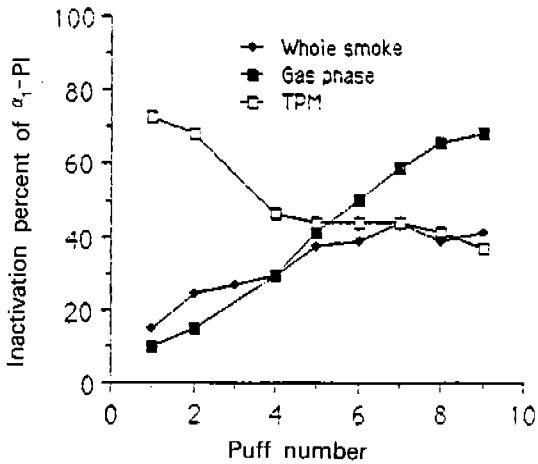


Fig. 1. Effect of cigarette smoke puff number on the inactivation of α_1 -PI.

또한 담배를 dose response가 있는 5 puff까지 연소시킨후 시간이 경과함에 따른 단백질분해효소 억제제의 활성을 측정 한 결과는 그림 2와 같았다. Gas phase, TPM 및 whole smoke에서 모두 α_1 -PI가 빠른 속도로 불활성화되었으며 24시간 이후 수일에 걸쳐 계속적으로 완만하게 불활성화되었다. Gas phase의 경우 elastase를 사용하였을 때 1분 이내에 α_1 -PI가 급속하게 불활성된다는 보고¹⁰⁾와는 달리 초기에 α_1 -PI의 불활성화가 매우 적었다. 한편 Whole smoke의 경우 gas phase와 경시적 변화양상은 비슷하였으나 α_1 -PI의 불활성화 정도는 다소 낮았다. 이는 앞의 결과와 함께 TPM중 어떤 성분들이 gas phase와 복합적으로 작용하여 α_1 -PI의 불활성화를 어느 정도 상쇄해 주는 효과가 있음을 시사한다.

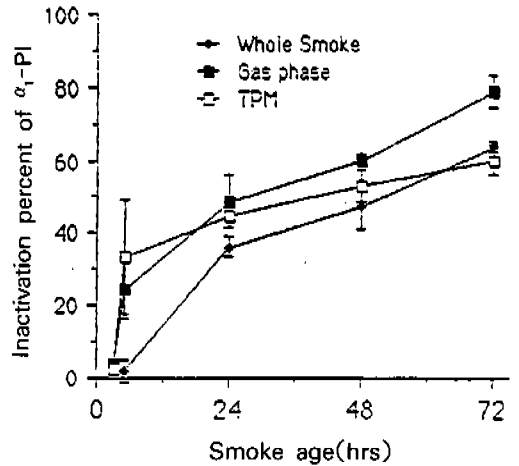


Fig. 2. Effect of cigarette smoke age on the inactivation of α_1 -PI.

이상의 결과로부터 α_1 -PI를 이용하여 담배품질 평가를 위해서는 담배를 5 puff까지 연소시켜 그 연기에 직접 노출된 α_1 -PI용액을 실온에서 24시간 방치시켜 비교적 완만하게 불활성화가 일어나는 시점에서 TIC를 측정하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

2. 제품담배와 α_1 -PI의 불활성화

Tar함량과 α_1 -PI의 불활성화정도의 관계를 알아보기 위하여 현행 담배중 비교적 저tar인 한라산

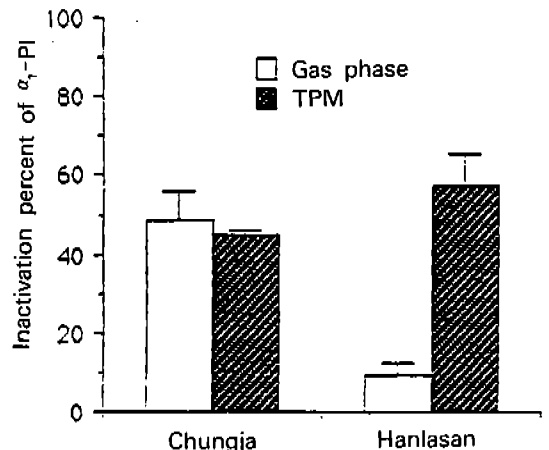


Fig. 3. Comparison of α_1 -PI inactivation by high tar and low tar cigarettes.

담배와 이와는 반대로 tar, nicotine 함량이 많은 청자를 5 puff 연소시켜 실온에서 24시간 방치한 후 α_1 -PI의 불활성화를 측정하였다. 그 결과 gas phase의 경우 청자가 한라산보다 5배나 더 많이 α_1 -PI를 불활성화시켰다(Fig. 3). 한편 TPM에서는 α_1 -PI의 불활성이 저타르인 한라산에서 고타르인 청자보다 더 높았으나 gas phase에서처럼 큰 차이는 없었다. 이 결과는 tar 함량이 많은 담배가 α_1 -PI를 더 많이 불활성화시키는 것으로 보인다.

위의 결과를 확인하기 위하여 tar와 nicotine 함량이 다양한 여러 종의 국산 및 외산 담배를 가지고 α_1 -PI의 불활성화를 측정하였다(Fig. 4). 그 결과는 α_1 -PI의 불활성화가 tar나 nicotine의 함량과 상관성이 있다는 보고¹³⁾와는 달리 거의 상관성이 없었다.

Gas phase의 경우 대체로 tar 함량이 증가할수록 α_1 -PI의 불활성화가 증가되는 경향을 보였다(Fig. 5). 그러나 N처럼 tar 함량이 많지만 α_1 -PI의 불활성이 매우 적은 경우와 C와 같이 이와는 정반대의 결과도

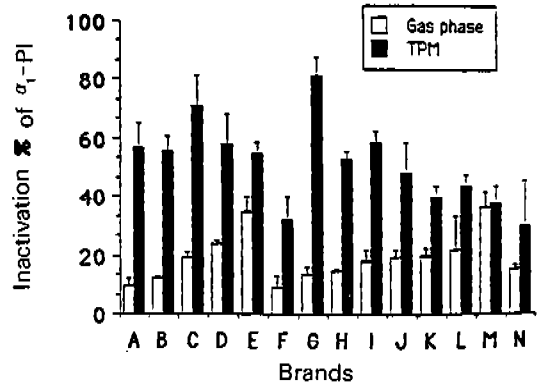


Fig. 4. Comparison of α_1 -PI inactivation by brand of cigarettes.

보였다. 또한 nicotine의 함량과 비교해 볼때 N과 I처럼 거의 상관성이 없는 결과를 나타내었다(Fig. 6). TPM의 경우 tar 함량이 증가함에 따라 α_1 -PI의 불활성이 줄어드는 경향이 있었으나 그 차이가 유의성이 없었으며 nicotine의 함량과도 거의 상관성이 없었다.

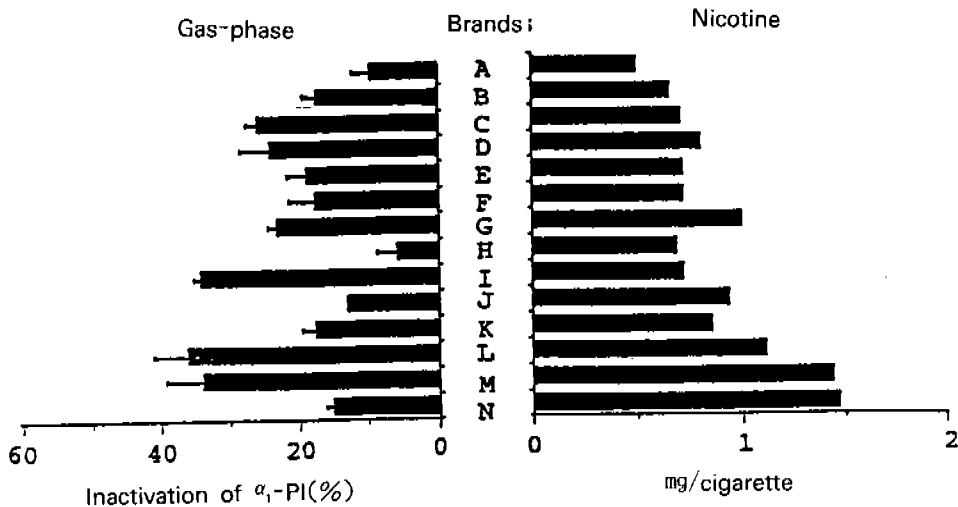


Fig. 5. Comparison of inactivation of α_1 -PI by gas phase cigarette smoke and tar contents.

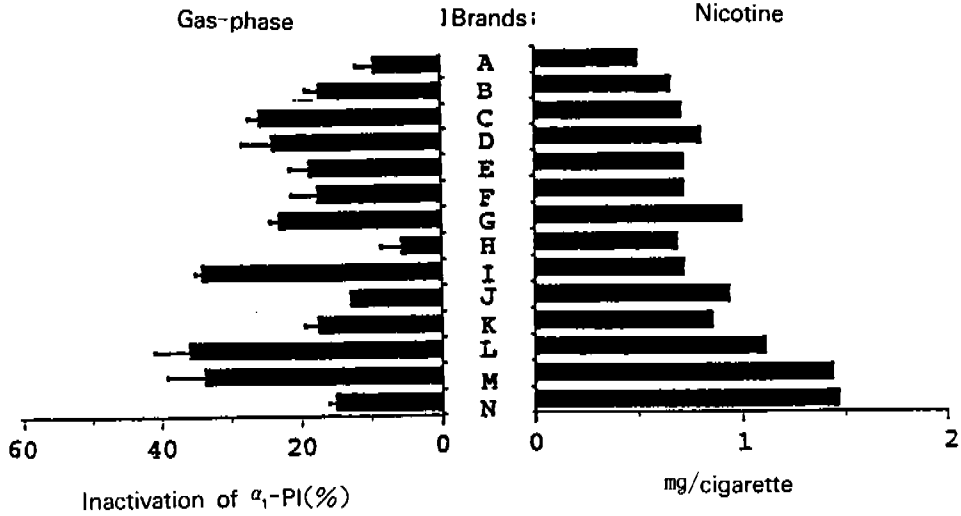


Fig. 6. Comparison of inactivation of α_1 -PI by gas phase cigarette smoke and nicotine contents.

3. 흡착제 종류에 대한 α_1 -PI의 불활성화

충진제가 서로 다른 삼중필터 시제품에 대한 α_1 -PI의 불활성화 정도를 비교한 결과(Table 1) 충전제간 유의성은 없으나 active carbon이나 silica gel 충전 filter담배가 zeolite나 polyethylene glycol 충전 filter담배보다 α_1 -PI의 불활성화가 다소 적었다.

4. Free radical scavenger 탐색 및 활용성 검토

담배연기중 반응성이 큰 free radical들을 제거할 수 있는 ascorbic acid등 항산화제 및 free radical scavenger들을 α_1 -PI용액에 첨가하여 이들에 의한 α_1 -PI의 보호효과를 조사하였다.

그 결과 그림 7과 같이 NAC, ascorbic acid 및

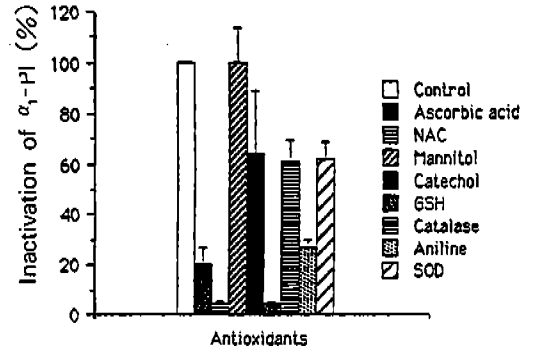


Fig. 7. Protection effect of antioxidants and free radical scavengers against inactivation of α_1 -PI by gas phase cigarette smoke.

Table 1. Comparison of α_1 -PI inactivation by various adsorbent triple filter of cigarettes.

Adsorbent	Inactivation of α_1 -PI*
Zeolite	48.4 ± 6.7
Active carbon	35.4 ± 5.5
Silica gel	39.2 ± 3.4
Polyethylene glycol	48.2 ± 4.8

* Inactivation of α_1 -PI by gas phase cigarette smoke

glutathione이 α_1 -PI의 불활성화를 현저하게 감소시켰으며 catalase, SOD 그리고 aniline도 어느 정도 보호효과를 보여주었다. 비록 이는 *in vitro*의 경우이나 담배 filter등에 유용한 free radical scavenger들의 적용가능성을 시사해 준다.

고 찰

α_1 -PI는 폐조직에 있는 호구성 백혈구 elastase의 주된 regulator이다.

흡연과 관련하여 α_1 -PI에 영향을 줄 수 있는 활성산소의 생성은 두 가지로 생각할 수 있다. 즉 한 가지는 흡연으로 인해 폐조직의 자극으로 유도되는 대식세포로부터 생성되는 것으로서 이는 많은 양의 elastase의 분비를 수반하기 때문에 폐조직 손상에 매우 큰 영향을 줄 수 있다^{12,13)}. 다른 하나는 연기 중에서 직접 생성되는 것으로서 특히 gas phase에 있는 여러 가지 산화제들과 더불어 생체조직은 물론 담배의 맛에 영향을 줄 수 있는 중요한 요소이다. 그러나 이들에 대한 전체적인 정량이나 양의 변화를 측정할 수 있는 방법은 없다. 저자들은 이러한 흡연과 호흡기계의 생리적인 기능을 이용하여 제조 담배의 품질을 평가할 수 있는 새로운 방법을 모색하였다.

α_1 -PI는 elastase, trypsin, serine protease등 여러 가지 단백질분해효소의 활성을 억제하지만 elastase에 대한 작용이 생리적인 의미가 가장 크다. 그러나 저자들은 elastase 대신 trypsin을 사용하였는데 이는 elastase의 정제가 어렵고 가격 또한 비싼 반면 trypsin저해능의 측정은 비교적 손쉽고 그 비용 또한 저렴하기 때문이다. α_1 -PI가 trypsin에 대한 선택성이 elastase에 비해 다소 낮기는 하나 그 불활성화 양상이 elastase와 유사하며 더우기 trypsin저해능의 90%가 α_1 -PI에 의존하므로¹⁴⁾ 이를 평가함에 있어 큰 무리가 없을 것으로 사료된다.

담배연기의 puff수 및 노출시간 경과에 따른 α_1 -PI 불활성화의 결과는 매우 흥미있는 변화를 보여주었다. Whole smoke, gas phase 및 TPM 모두에서 적어도 5 puff(high tar)까지는 양호한 dose response를 나타내어 정량범위로서의 가능성을 보였다.

또한 담배연기에 의한 α_1 -PI의 불활성화가 장시간에 걸쳐 지속적이며 linear하게 나타났다. 한편 gas phase가 가장 빨리 그리고 가장 많이 α_1 -PI의 활성을 억제하였으며 TPM은 상대적으로 낮았고 전연기에 의한 α_1 -PI의 불활성화도 gas phase보다 낮았다.

이는 α_1 -PI의 active center에 있는 methionine이 산화적 손상을 받아 sulfoxide나 sulfone의 형태로 불활성화된다는 보고를¹⁵⁾ 참조해 볼때 TPM의 환경이 gas phase와는 달리 환원적인 조건이어서 TPM함량의 증가가 α_1 -PI에 크게 영향을 미치지 못하거나 TPM중 어떤 성분(들)이 gas phase에서의 free radical반응을 막아주는 것으로도 해석된다. 전연기성분이 gas phase보다 억제효과가 적은 것도 이 사실을 뒷받침하는 좋은 증거가 될 수 있다. 그러나 이에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

α_1 -PI의 불활성화를 이용한 이 방법은 품질평가 측면에서 몇가지 의의있는 시도로 사료된다. 첫째, 몇 개피의 담배로 측정이 가능하다는 점이다. 이는 수십 개피를 태워 얻은 TPM 혹은 gas phase에서 얻은 결과에 비해 매우 간단한 방법이기 때문이다. 둘째는 전연기성분에 대한 평가가 가능하다는 점이다. 이는 α_1 -PI에 영향을 줄 수 있는 화합물들이 여러 source로부터 생성될 수 있으나 이를 종합적으로 평가할 수 있다는 점이다. 여러 가지 시판담배에 대하여 측정된 α_1 -PI의 불활성성을 tar나 nicotine의 함량과 비교해보면 일관된 상관성을 보이지 않았다. 이는 두 가지로 생각될 수 있다. 하나는 염조나 다른 담배구성성분의 차이에 의해 연소시 활성산소나 nitric oxide등 hydroxyl radical을 생성할 수 있는 성분들의 차이로 볼 수 있으며 다른 하나는 filter흡착능 차이로 볼 수 있다. 어떤 원인에 기인되었든간에 α_1 -PI의 억제정도는 생체에 보다 직접적인 방법으로 품질을 평가할 수 있는 새로운 방법으로 활용될 수 있음을 보여준다.

세제는 담배 filter의 개발등 제조담배에 응용할 수 있는 점이다. 최근 연기성분을 선택적으로 흡착할 수 있는 filter개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 이들중 항산화 filter담배는 연기중의 산화제를 제거해주는 것으로서 각광을 받고 있다. 그러나 이들의 제거 정도를 aldehyde등을 측정하여 비교

하는데 이들은 자극성 등 맛에 영향을 주는 중요한 산화제들이지만 수분과의 반응성이 크기 때문에 H_2O_2 , OH 및 NO 등에 비해 직연위생상의 의미는 훨씬 약하다.

따라서 이 방법을 활용하여 산화제를 잘 capture할 수 있는 물질을 선별하여 이를 담배 filter에 응용하면 애연가의 건강을 보호할 수 있는 담배 제조에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

담배연기는 α_1 -PI를 빠른 속도로 불활성화시키며 담배의 종류 그리고 filter의 종류에 따라 그 정도가 달리 나타났다. 이는 전연기성분이 생체에 미치는 효과를 간접적으로 측정할 수 있는 간단하고 신속한 방법으로 흡연가의 건강 측면에서 담배의 품질을 평가할 수 있는 유용한 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다.

또한 담배연기중 산화제를 감소시킬 수 있는 항산화제 filter의 개발에 활용될 수 있으며 이와같은 신제품 개발을 통해 덜 해로운 담배제조에 일조할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Aaron Janoff, American Physiological Society : 285-293(1983).
2. Hunninghake, G. W. and Crystal, R. G., Am Rev Respir Dis : 833-838(1983).
3. Church, D. F. and Pryor, W. A., Environmental Health Perspectives 64 : 111-126(1985).
4. Pryor, W. A., Pulmonary Emphysema and Proteolysis : 369-392(1986).
5. Aaron Janoff, Am Rev Respir Dis 132 : 417-433(1985).
6. Coagrove, J. P., Borish, E. T., Church, D. F., and Pryor, W. A., Biochem Biophys Res Commun, 132 : 390-396(1985).
7. Pryor, W. A., Uehara, K., and Church, D. F., J Am Chem Soc, 106 : 5073-5079(1984).
8. Lim, H. B., Kim, S. Y., Moon, J. Y., Lee, D. W., and Kim, Y. T., J Korean Soc Tobacco Sci, 12(1) : 19-27(1991).
9. Witt, I. and Lill, H., Methods of Enzymatic Analysis 3rd ed 5 : 448-455(1968).
10. Pryor, W. A., Dooley, M. M., and Church, D. F., Biochemical and Biochemical Research Communications, 122(2) : 676-681(1984).
11. Cohen, A. B. and James, H. L., Am Rev Respir Dis, 126 : 25-30(1982).
12. Janoff, A., Annu Rev Med, 36 : 207-216(1985).
13. Janoff, A., J Appl Physiol, 55 : 285-293(1983).
14. Talamo, R. C., Bruce, R. M., Berninger, R. W., Pierce, J. A., Brant, L. J., and Duncan, D. B., Alpha₁-Antitrypsin Laboratory Manual : 21-29(1978).
15. Johnson, D. and Travis, J., the Journal of Biological Chemistry 254(10) : 4022-4026(1979).

옥수수 轉移因子 Ac가 導入된 煙草組織의 再分化

박성원, 최광태, 박지창, 김영진*

한국인삼연초연구소 유전생리부

* : 충남대학교 생물학과

Regeneration of Tobacco Tissue Introduced with the Maize Transposable Element Activator

S. W. Park, K. T. Choi, J. C. Park, and Y. J. Kim*

Division of Genetics and Physiology, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

* : Department of Biology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

ABSTRACT

To explore the possibility of introducing *Zea mays* transposable element Ac(activator) which can be used as a mutagen and gene tag in tobacco plants other than maize, we tried to introduce a cloned Ac element into tobacco cells by an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system. Transformation of *N. tabacum* cv. Burley 21 tissues and regeneration to whole plant were carried out. The frequency of the transformed callus induced in shoot induction media was higher than that of transformed callus induced in callus induction media.

However, the calli were not grown in the second selection media, and became yellow senescent calli. Regenerated tobacco plantlets with foreign gene were also obtained in shoot induction media containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ carbenicillin. The leaf tissues of transformant was also resistant to 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin. The chromosomal DNAs of transformant and normal plant of *N. tabacum* were digested by EcoR I and HindIII but not by Pst I.

서 론

식물의 형질전환 vector 로서 *Agrobacterium* 균주

의 Ti plasmid를 이용하는 경우 vector의 이용 방법은 다른 생물의 유전자를 homologous recombination에 의해 Ti plasmid에 삽입시키는 intermediate

vector system을 이용하는 방법(Matzke and Chilton, 1981)과 제한효소를 처리하여 다른 생물의 유전자를 직접 vector에 삽입하는 DNA를 세균에서 식물세포로 이동시키는데에 필요한 유전자(*cis* acting element)인 T-DNA border sequence 그리고 *A. tumefaciens* 균주와 *E. coli* 균주 양쪽 모두에서 발현될 수 있는 replicon과 식물에서 발현을 확인할 수 있는 표지 유전자만 있으면 되므로 그 plasmid 유전자의 크기는 *A. tumefaciens* 균주의 Ti plasmid 보다 상당히 작으며 그 조작 또한 간편하다. 그리고 유전자의 이동에 필요한 *vir* 유전자는 Ti plasmid에 의해 따로 떨어져서 (*in trans*로) 작용하므로 *E. coli*에서 유전자 조작으로 binary vector에 삽입된 유전자는 이미 Ti plasmid를 갖고 있는 *A. tumefaciens* 균주로 이동되며 이때 균주는 binary vector와 Ti plasmid를 동시에 함유하게 된다. 따라서 식물 세포의 형질전환은 binary vector와 helper plasmid를 동시에 갖고 있는 *A. tumefaciens* 균주와의 동시 배양 방법에 의해 이루어지게 된다.

현재 형질전환을 이룩하고자 하는 품종들도 급속히 증가되고 있으며 식물에 도입하고자 하는 다른 생물의 유전자도 내병성, 내충성, 제초제 내성 등의 여러가지 종류의 유용한 유전자들을 대상으로 하고 있다(Raineri *et al.*, 1990).

옥수수의 전이인자 중 Activator-Dissociation (Ac-Ds) element는 McClintock이 1948년에 처음으로 보고한 전이인자이다. 옥수수의 전분합성에 관여하는 *waxy* (*wx*) 유전자에서 처음으로 Ac유전자가 분리되었으며 (Fedoroff *et al.*, 1983), 그 유전자의 크기는 4.6 kbp이고, 양쪽 끝에 11 bp의 말단 역반복 서열(terminal inverted repeated sequence)이 있으며 전이하여 삽입될 때마다 8 bp의 복제가 일어난다(Pohlman *et al.*, 1984). Ac유전자의 전이는 세포의 생리적 상태에 따라 달라지며 (Schwartz, 1984), dosage effect에 의하여 세포내에서 copy수가 증가하면서 전이인자가 repressor를 만들어 전이를 억제하며 (Schwartz and Echt, 1982), Ac유전자의 methylation으로도 전이를 못할 수도 있다(Chomet *et al.*, 1987).

최근에 Ac유전자를 이용하여 gene tagging방법

(Hehl and Baker, 1990)으로 유용한 유전자를 cloning하고자 옥수수 이외의 식물에도 이러한 전이인자를 이용, 형질전환을 유도하려는 연구가 많이 수행되고 있으며, Ac유전자가 옥수수이외에 연초 (Baker *et al.*, 1987)나 당근, *Arabidopsis thaliana* (Van. Sluys *et al.*, 1987), 토마토(Yoder *et al.*, 1987), 콩(Zhou and Atherly, 1990)등에서 전이된다는 보고들이 있다. 본 연구는 외부유전자가 도입된 버어리종 담배를 얻고자 수행되었으며, 버어리종 담배(Burley 21) 조직에 외부유전자로는 식물체에서 유전자 cloning수단으로 이용 가능성이 있는 전이인자 Activator(Ac)유전자의 도입을 시도하였고, 형질전환된 담배조직에서 식물체 재분화를 시도하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 *Escherichia coli* 균주는 vector의 형질전환, 증식 및 보관에 사용하였으며 *Agrobacterium tumefaciens* 균주는 연초의 형질전환을 위한 host로 사용하였다. 선택배지인 경우에 *E. coli*의 배지에는 kanamycin(Km) 25 ug/ml과 chloramphenicol(Cm) 25 ug/ml, tetracyclin(Tc) 10 ug/ml을 각각 사용하였으며, *A. tumefaciens*의 배지에는 Km 25 ug/ml, Cm 25 ug/ml, Tc 2.5 ug/ml을 각각 사용하였다. 본 실험에 사용된 연초의 품종은 재배종 연초로서 *Nicotiana tabacum* cv. Burley 21을 파종후 25 ~ 27 °C인공기상실에서 8 ~ 12주 동안 재배한 연초를 실험재료로 사용하였다. 본 실험에 사용된 제한효소들과 T4 DNA ligase는 Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica회사에서 구입하였고 그밖의 모든 시약들은 Bethesda Research Laboratories회사와 Sigma회사에서 구입하여 사용하였다.

재조합된 binary vector의 제조

Ti plasmid vector system의 일종인 binary vector pEND4K(Klee *et al.*, 1985)를 vector plasmid로 사용하였으며 옥수수 전이인자 Ac유전자가 *waxy* 유전자에 삽입되어 mutant가 된 *wx-m7*에서

clone한 *wx-m7(Ac)* 유전자 (Behren *et al.*, 1984과 Fedoroff *et al.*, 1983)를 다른 생물의 유전자로 사용하였다. *Wx-m7* clone을 Sal I 과 Eco RV 제한효소로 이중처리하여 pBS(+) plasmid의 Sal I 과 Sma I site에 삽입하여 BMPac7을 제조하였으며, BMPac7을 제한효소 Kpn I 과 Sal I 을 처리한 절편을 pEND4K의 Kpn I 과 Sal I site에 삽입하여 제조한 재조합 pEND4K-Ac7 plasmid(Lim *et al.*, 1990)을 사용하였다.

Binary vector의 *Agrobacterium* 내로의 도입

Plasmid DNA에 의한 *A. tumefaciens*의 형질전환은 An(1987)의 triparental mating 방법을 사용하였으며, 이때 donor인 *E. coli* 균주는 kanamycin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, chloramphenicol 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 LB배지에서 배양하였으며, helper인 *E. coli* 균주는 kanamycin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 LB배지에서 배양하였다. 형질전환된 균주는 kanamycin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 chloramphenicol 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 AB배지에서 배양하여 선발하였다. Tetracycline 항생제의 농도는 *E. coli*의 배지에서는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *A. tumefaciens*의 배지에서는 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가하여 사용하였다.

*A. tumefaciens*에 의한 연초조직의 형질전환

연초의 형질전환 실험은 연초의 엽육 조직을 70% ethanol에서 멸균한 후 bleach(1% sodium hypochlorite) 용액에 10~15분간 멸균하고 증류수로 3

회이상 수세하였다. 수세후 잎을 작은 절편으로 만들어 이미 배양된 *A. tumefaciens* 균주와 액체 callus유기 배지에서 동시 배양을 하였다. 이때 균주의 농도는 $10^8 \sim 10^9$ cells/ml이었으며 동시배양은 1~3일간 수행하였다. 동시배양후 멸균된 여과지에 배양액을 최대로 제거한 다음 kanamycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 carbenicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 선택배지에 치상하여 형질전환체를 선발하였다. 선택배지의 hormone농도는 callus유기배지에는 2, 4-D 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 첨가된 MS 배지를 사용하였고 뿌리유기배지에는 호르몬을 첨가하지 않았다.

결과 및 고찰

*A. tumefaciens*에 의한 연초조직의 형질전환

연초의 형질전환조직을 선발, 육성하고자 항생제 내성이 있는 재조합 binary vector가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* 균주와 연초조직을 동시배양한 후 kanamycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, carbenicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하고 2, 4-D 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kinetin 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 callus유기배지와 auxin은 첨가하지 않고 BA 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 만 첨가한 shoot유기배지에 연초품종별 explant를 각각 배양하여 callus유기율을 조사하였던 바, 그 결과는 Tables 1, 2와 같다.

재조합된 binary vector pEND4K-Ac7로 형질전환된 callus의 유기율을 보면, 2, 4-D와 kinetin을

Table 1. Formation rate of callus in transformed tobacco cultured on the callus induction medium

Variety	No. of explants inoculated	No. of explants with callus	%
Burley 21	227	2	0.9

Table 2. Formation rate of callus in transformed tobacco cultured on the shoot induction medium

Variety	No. of explants inoculated	No. of explants with callus	%
Burley 21	168	33	19.6

함께 첨가한 callus유기배지에서는 0.9 ~ 3.7%의 낮은 유기율을 보인 반면, BA만 첨가한 shoot유기배지는 12.6 ~ 19.6%의 높은 유기율을 보였다 (Tables 1, 2). 두 종류의 배지 공히 품종간 차이가 있었으며 특히 BA만 첨가한 shoot유기배지에서 배양한 Br21 품종이 19.6%로서 가장 높은 callus 유기율을 보였다. 그리고 유기된 callus를 형질전환체 선발배지에서 계속 배양하게 되면 노화현상이 일어나 갈변화되는 경향을 보였다. Baker 등(1986)은 Ac유전자를 연초의 protoplast에 형질전환하여 kanamycin 200 µg/ml의 농도에서 형질전환체를 선발하는 경우 Ac유전자가 없이 형질전환했을 때보다 형질전환체가 나타나는 빈도는 약 25% 이하로 낮아진다고 보고하였는 바, 본 연구에서도 형질전환체의 출현빈도가 Ac유전자 없이 형질전환한 경우보다 낮게 나타나는 것으로 보아 그들의 결과와 같은 경향을 보였다. 그러나 Baker 등(1987)의 실험에서는 형질전환되어 완전히 재분화된 연초를 얻지는 못했다.

유기된 callus가 형질전환체의 선발배지에서 더 이상 성장하지 못하였지만 Table 2에서 보는 바와 같이 shoot유기배지에서 callus유기율이 높았으므로 pEND4K-Ac7의 형질전환은 shoot 유기 배지에서 시도하는 것이 형질전환체의 출현빈도가 높을 것으로 생각되어 형질전환 후 selection marker인 kanamycin 100 µg/ml와 carbenicillin 100 µg/ml가 포함된 shoot유기배지에서 연초의 형질전환체 유기 및 재분화를 시도하였다.

형질전환된 연초조직의 재분화

옥수수의 전이인자 Ac유전자를 연초에 도입하기 위하여, Ac유전자가 삽입된 binary vector pEND4K-Ac7 plasmid를 포함하고 있는 *A. tumefaciens* A281균주와 연초조직을 동시배양법에 의해 형질전환을 시도하였으며, 선택배지를 이용하여 형질전환체를 선발하였고, 이들 형질전환체로부터 연초 식물체 재분화를 시도하였다. 식물체의 재분화는 Ac유전자가 포함된 pEND4K-Ac7 plasmid로 형질전환 실험을 수행한 연초 조직에서 유기된 callus에서는 재분화에 성공을 하지 못하였으나 Ac유전

자가 없는 pEND4K plasmid 혹은 pGA643 plasmid 등으로 형질전환 실험을 수행한 연초 조직에서 유기된 callus에서는 재분화가 되었다.

Baker 등(1987)은 Ac유전자를 NPTII 유전자의 untranslated leader region에 삽입했을 경우 연초에 Ac유전자가 이동하면 kanamycin내성을 갖게 하는 vector를 만들어 연초의 원형질체를 이용하여 형질전환된 clone을 만들고 이들에서 DNA를 분석한 결과 연초에서도 Ac유전자가 이동한다고 보고하였고, Zhou 등(1990)은 콩에서 Ac유전자가 삽입된 β-glucuronidase(GUS) 유전자의 표현형으로 Ac유전자가 콩의 callus 및 재분화된 조직에서 모두 이동한다는 보고를 하였다. 따라서 이들의 보고에 비추어 볼때 pEND4K-Ac7 plasmid로 형질전환되어 유기된 callus에서 더 이상의 재분화가 되지 않는 것은 Ac유전자가 연초세포에서 스스로 이동하여 생육에 필수적인 유전자에 삽입되어 더 이상 분열을 못하고 생장이 중단된 것으로 사료되나 추후 이에 대한 연구검토가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

전이인자의 도입으로 형질전환된 콩에 대한 연구결과(Zhou and Atherly, 1990)를 참고로 하여 연초에서도 전이인자가 도입되어 재분화된 재배종 연초를 얻고자 형질전환에 이용될 때 종양을 유기하는 *A. tumefaciens* A281균주를 *A. tumefaciens* LBA4404균주로 대체한 후 *A. tumefaciens* 균주와 연초의 동시배양 시간을 1 ~ 2일에서 2 ~ 3일로 연장하고, 형질전환체의 선발배지의 hormone의 종류 및 농도를 달리하여 형질전환 실험을 계속 수행하였다. 그 결과 Ac유전자가 삽입된 pEND4K-Ac7 plasmid에 의해 형질전환된 연초조직중 처음으로 버어리종 Br21에서 shoot와 callus가 유기되었으며(Fig. 1), 유기율은 10⁻⁴ 정도로 나타났다. 재분화가 잘되지 않았던 이전의 형질전환된 조직에서 유기된 callus는 주로 엽맥에서 형질전환체가 형성되었으나 현재 유기된 shoot의 잎조직의 상처감염 부위에서 직접 shoot가 유기되기도 하였고, 조직 가장자리의 상처난 부위에서도 shoot가 유기될 callus같은 조직이 유기되기도 하였다(Fig. 1). 약 6주 배양후에는 Fig. 2와 같이 callus에서 유기된 shoot와 직접 shoot에서 자라는 shoot를 판

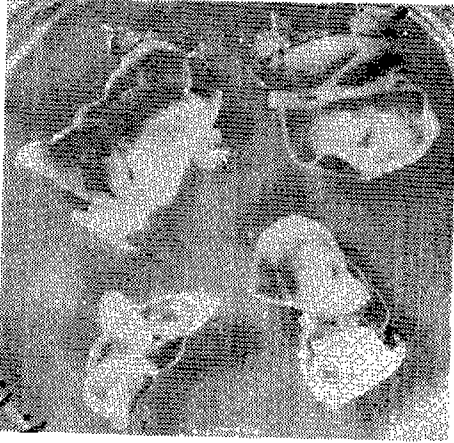


Figure 1. Shoots and calli induced directly from *N. tabacum* cv. Barley 21 leaf tissues cocultured.

N. tabacum leaf tissues were cocultured with *A. tumefaciens* A281 containing pEND4K-Ac7 plasmid and incubated in the selection medium(BN) containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of kanamycin and 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of carbenicillin for 4 weeks after cocultivation.

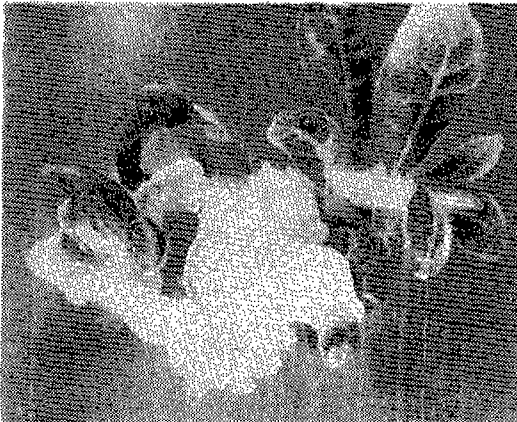


Figure 2. Growth of shoots induced from *N. tabacum* calli.

N. tabacum cv. Burley 21 leaf tissues were cocultured with *A. tumefaciens* A 281 containing pEND4K-Ac7 plasmid and incubated in selection medium(BN) containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of kanamycin and 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of carbenicillin for 6 weeks after cocultivations.

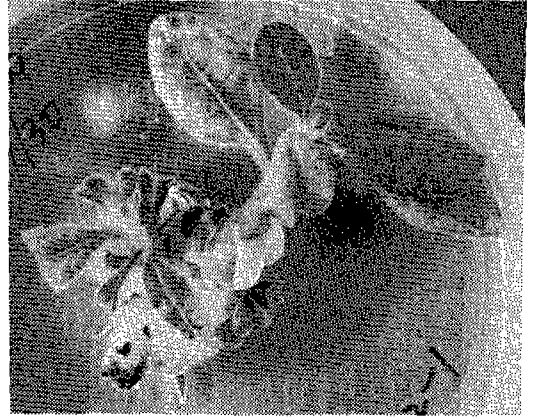


Figure 3. Growth of multi shoots induced from *N. tabacum* shoots.

Shoots of *N. tabacum* cv. Br21 were induced directly and incubated in selection medium(BN) for 9 weeks after cocultivation.

찰할 수 있었고 약 9주 배양후에는 Fig. 3과 같은 multi shoot도 관찰되었다. 그리고 single shoot로 유기된 shoot를 kanamycin이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가된 root유기 배지에 옮겨 root를 유기하고 Fig. 4와 같이 root가 유기된 재분화 연초를 화분에 이식하여 온실에서 배양하면서 재분화된 연초(Fig. 5)의 특성 조사를 수행하였다.

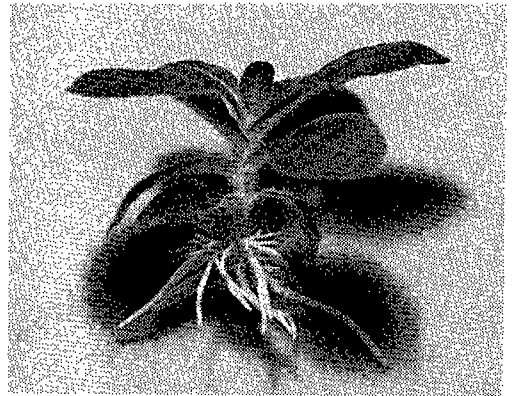


Figure 4. Induction of roots from shoots.

Induced shoots of *N. tabacum* cv. Br21 were incubated in root induction medium containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of kanamycin.

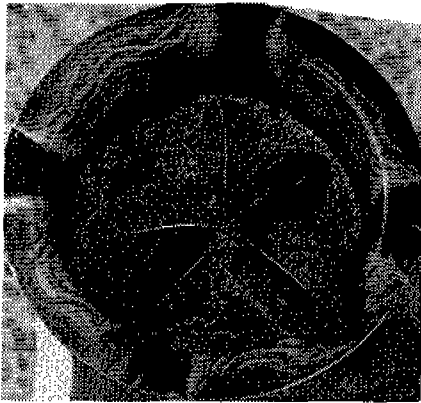


Figure 5. *N. tabacum* cv. Br21 whole plants regenerated.

N. tabacum cv. Br21 tissues were cocultured with *A. tumefaciens* A281 containing pEND4K-Ac7 plasmid and selected by kanamycin resistance.

형질전환 식물체의 특성

형질전환에 이용된 재조합된 vector plasmid인 pEND4K-Ac7 plasmid는 Ti-plasmid의 T-DNA border sequences를 함유하고 있고 그 양쪽의 border sequences 사이에 도입된 Ac유전자와 표지 유전자 NPTII 등이 동시에 존재하고 있다. pEND4K-Ac7 plasmid로 형질전환된 연초는 일차적으로 kanamycin에 내성을 갖고 있는지 여부로 형질전환체의 선발이 이루어 지므로, 항생제 kanamycin에 내성이 있으면 pEND4K-Ac7 plasmid의 T-DNA

border sequence 사이에 존재하는 유전자가 동시에 연초에 도입되었다고 판단할 수가 있는 것이다. 그러므로 Ac유전자가 도입되어 재분화된 연초의 특성을 먼저 조사하기 위하여 형질전환되어 재분화된 연초의 표지 유전자에 대한 kanamycin의 내성을 조사하였던 바, 그 결과는 Table 3과 같다. Ac유전자가 삽입된 pEND4K-Ac plasmid로 형질전환시킨 callus로부터 재분화된 연초는 Burley 21이었으며 재분화된 품종의 조직에 대한 항생제 내성을 조사한 결과 kanamycin 1000 µg/ml의 농도에서도 내성을 지녀 생장을 하였다(Table 3). 이는 재분화된 연초가 일차적으로 형질전환체임을 나타내는 증거라고 볼 수 있다. 그러나 형질전환시킨 재분화 식물체에 대한 좀 더 확실한 결과는 재분화 연초가 더 성장한 후에 DNA를 분리하여 southern blot에 의해 Ac유전자를 확인하면 밝혀질 것으로 사료된다. 이에 관해 Klee등(1987)은 kanamycin이 300 µg/ml 첨가된 배지에서 내성을 나타내 선발된 형질전환체에도 도입된 유전자가 존재한다고 보고한 바 있다.

Ac유전자가 도입되어 재분화된 연초조직과 정상 연초조직에서 각각 염색체 DNA를 분리하여 EcoRI 과 HindIII, Pst I 등의 제한효소를 처리하여 전기영동을 수행한 결과 Br 21의 재분화된 연초조직과 정상연초조직의 염색체 DNA는 EcoR I 과 HindIII 제한효소에는 비교적 절단이 잘되었으며, Pst I 제한효소에는 절단이 잘되지 않는 특징을 나타냈다(Fig. 6). 이러한 특징은 앞으로 재배종 연초의

Table 3. Response of regenerated *N. tabacum* tissues to kanamycin

Varieties	Con. of kanamycin (µg/ml)					
	50	100	300	500	800	1000
Untransformed Burley 21	+	-	-	-	-	-
Transformed Burley 21	+	+	+	+	+	+

+ : survival, - : nonsurvival.

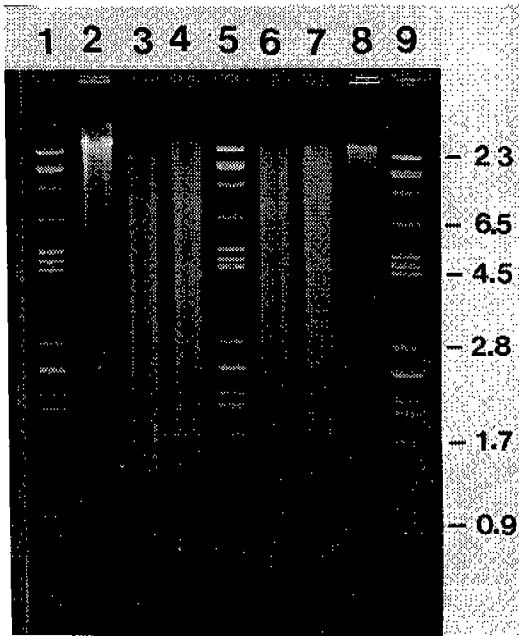


Figure 6. Restriction patterns of chromosomal DNA of transformed and untransformed *N. tabacum* cv. Br21.

The chromosomal DNA was isolated from leaf tissues, digested with restriction endonuclease and loaded 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of DNA in each well. Lane 1, 5, 9 : Lambda + HindIII + Pst I, Lane 2, 3, 4 : untransformed *N. tabacum* Br 21, Lane 6, 7, 8 : transformed *N. tabacum* Br21, Lane 2, 8 : Pst I, Lane 3, 7 : EcoR I, Lane 4, 6 : HindIII.

염색체 DNA 특성 연구에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

현재 재분화된 연초에서 그 유전적 변이의 조사가 진행되고 있으며, 재분화된 식물체로부터 DNA를 분리하여 Ac의 transposition기능과 empty donor site의 변화 등을 추적함으로써 연초의 transposition기작을 구명할 예정으로 있다. 또한 재분화된 연초에서 Ac copy수가 적은 변이주를 선발하고 선발된 변이주를 이용하여 유용유전자의 cloning도 가능할 것으로 사료된다.

결 론

식물체에서 유전자 clining수단으로 이용 가능성이 있는 옥수수의 전이인자 activator(Ac) 유전자가 연초에 도입 가능한지 여부를 구명하기 위하여 *Agrobacterium tumefaciens* 균주의 binary vector system을 이용하여 연초조직의 형질전환을 시키고 이들 형질전환체 조직에서 식물체를 재분화하였던 바, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 옥수수의 전이인자인 Ac유전자로 형질전환된 연초조직의 발생율은 callus유기배지보다 shoot유기배지가 높았다.
2. 외부유전자가 도입된 버어리종 연초의 재분화는 kanamycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 carbenicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 shoot유기배지에서 가능하였다.
3. 형질전환된 연초식물체에서 적절한 조직의 항생제 반응을 보면 kanamycin 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 내성을 나타내었다.
4. 형질전환 연초조직과 정상 연초조직의 염색체 DNA의 제한효소 EcoR I 과 HindIII, Pst I 에 대한 반응을 보면 두조직 공히 EcoR I 과 HindIII에는 절단이 잘 되었으나 Pst I 에는 절단되지 않았다.

참 고 문 헌

1. An, G. 1987. in Methods in Enzymology. R. Wu, and L. Grossman, eds., Academic Press, N. Y. 153, pp 292-305.
2. Baker, B., G. Coupland, N. Fedoroff, P. Starlinger, and J. Schell. 1987. EMBO J. 6, 1547-1554.
3. Baker, B., J. Schell, H. Lorz, and N. Fedoroff. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4844-4848.
4. Behrens, U., N. Fedoroff, A. Laird, M. Muller-Neumann, P. Starlinger, and J. Yoder. 1984. Mol. Gen. Genet. 194, 346-347.
5. Chomet, P. S., S. Wessler, and S. L. Dellaporta. 1987. EMBO J. 6, 295-302.

6. Fedoroff, N. V. 1983. *in* Mobile Genetic Elements. J. A. Shapiro, ed., Academic press, N. Y. pp 1-63.
7. Hehl, R. and B. Baker. 1990. Maize Genetic Cooperation Newsletter 64, p. 3.
8. Klee, H. J., M. F. Yonofsky, and E. W. Nester. 1985. Bio/Technology 3, 637-642.
9. Lim, Y. P., S. W. Park, J. Chen, S. L. Dellarporta, and K. T. Choi. 1990. Korean J. Plant Tissue Culture 17, 119-127.
10. Matzke, A. J. M. and M. D. Chilton. 1981. J. Mol. Appl. Genet. 1, 39-49.
11. Pohlman, R. F., N. V. Fedoroff, and J. Messing. 1984. Cell 37, 635-643.
12. Raineri, D. M., P. Bottino, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1990. Bio/Technology 8, 33-38.
13. Schwartz, D. 1984. Mol. Gen. Gente. 196, 81-84.
14. Schwartz, D. and C. S. Echt. 1982. Mol. Gen. Genet. 187, 410-413.
15. Van Sluys, M. A., J. Tempe, and N. Fedoroff. 1987. EMBO J. 6, 3881-3889.
16. Yoder, J., F. Belzile, K. Alpert, J. Palys, and R. Michelmore. 1987. *in* Tomato Biotechnology. R. Alan, ed., Less, N. Y. pp 189-198.
17. Zhou, J. H. and A. G. Atherly. 1990. Plant Cell Reports 8, 542-545.

비병원성 Bacteriocin 생성 *Pseudomonas solanacearum*을 이용한 담배 세균성마름병 방제

이영근

한국인삼연초연구소

Protection of Tobacco Plants from Bacterial Wilt with Avirulent Bacteriocin-Producing Strains of *Pseudomonas solanacearum*

Y. K. Yi

Korea Ginseng and Tobacco Reaserch Institute

ABSTRACT

Control effect of an avirulent bacteriocin-producing strain(ABPS) Y61-1 of *Pseudomonas solanacearum* on bacterial wilt was 58.8 % when the bacterial suspension had poured onto the rhizosphere soil of tobacco cultivar NC82 on one day before transplanting to the field and of hilling time. Until eight weeks after inoculation, survival of the strain on rhizoplane and in stem of the plants inoculated was better than that of other four strains tested. It suggested that survival of the ABPS in and on the plants should be supported for the sufficient protection.

서 론

Bacteriocin 생성균주를 이용한 토양전염성 식물 세균병 방제는 과수의 근두암중병(*Agrobacterium tumefaciens*)에 대해서는 큰 성공¹⁾을 거두었으나,

다른 세균병에 대해서는 아직 실용적인 단계에 이르지 못하고 있다.

*Pseudomonas solanacearum*의 bacteriocin 생성균주는 Cupples 등⁴⁾에 의하여 처음 보고된 이후 담배세균성마름병 방제 시험에도 많이 이용^{1,2,3,13)}

되었으며, 그 방제효과 면에서 bacteriocin 비생성 균주를 이용할 때보다 더 효과적인 것으로 보고²⁾ 되어 있다. 그 방제효과를 높이기 위하여 담배뿌리 표면 및 식물체 내에서 bacteriocin 생성균주의 밀도 유지가 중요하다고 하였으며^{9,14)}, 토양 내 병원세균의 밀도도 병 방제효과에 영향을 미친다고 하였다^{8,9)}. 그러나 우리 나라 환경 조건에서 이러한 방제효과가 검토·보고된 바는 아직 없다. 그 방제기작은 bacteriocin 자체의 항균효과^{2,3)}, 기주식물체 내 항균물질 생성^{7,10,13,15)}, 병원균의 식물체내 감염 부위 선점^{3,5,11,12)} 등 여러 가지로 해석되고 있다.

이 시험에서는 비병원성 Bacteriocin 생성 *P. solanacearum* 균주들을 담배뿌리에 처리하여 세균성 마름병에 대한 방제효과를 비교하고, 여러가지로 해석되고 있는 방제기작의 일부를 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 담배품종

한국인삼연초연구소 경작시험장 제 3 연구실에 보존되어 있는 균주⁹⁾들을 담배에 접종한 후 재분리하여 nutrient한천배지(bacto-peptone 5g, beef extract 3g, glucose 5g, 한천 20g)에서 30°C로 2일간 배양된 것을 사용하였다. Bacteriocin activity의 검정은 Chen의 방법¹⁾에 따라 한천중층법에 의하여 병원성 지표균주에 대한 발육저지원의 직경을 측정하였으며, 균주별 3반복으로 하였다. 이 균주들의 현탁액(10⁹ cfu/ml)에 파종 후 5주된 BY4 품종의 담배뿌리를 30분간 침지시킨후 처리별 5주씩 이식하여 21일간 발병 정도를 조사하였다. 발병 정도는 건진(6)에서부터 고사(5)까지 6등급으로 나누어 조사하였다. 담배는 세균성마름병에 대하여 저항성 품종으로 알려진 NC82와 KF109, 감수성 품종인 BY4의 종자를 한국인삼연초연구소 경작시험장 제 2 연구실에서 분양받아 사용하였다.

담배뿌리 및 식물체 내에서의 세균 밀도변화 조사

담배뿌리를 세균현탁액(10⁹ cfu/ml)에 30분간 침지시킨 후 이식하고, 담배뿌리 및 줄기를 처리별

Table 1. Bacteriocinogenic activities and pathogenicities of bacteriocin-producing isolates of *Pseudomonas solanacearum*.

Isolate	Origin	Diameter of inhibition zone(mm)*				Disease index**
		Y 5	Y 7	Y 8	Y 9	
Y 5	K 60	0	0	0	35	5.0
Y 10	K 60	25	0	0	31	4.6
Y 61-1	Y 61	20	26	26	21	0.0
Y 61-2	Y 61	17	26	25	15	0.0
Y 61-3	Y 61	20	25	23	28	0.0
Y 61-4	Y 61	19	25	20	29	0.0
Y 61-5	Y 61	23	19	0	23	0.0
Y 95-1	Y 95	0	14	0	0	0.0

* Each bacterial isolates was seeded with 4mm-diameter aluminum rod on casamino acid-peptone-glucose agar plate in 9cm petridish. After incubation at 30°C for 2 days, bacterial cells were killed by exposing them to the vapor of chloroform.

** Roots of 5-wk-old tobacco cultivar BY4 were dipped in each bacterial suspension(10⁹ cfu/ml) before transplanting. Disease index ranged from 0 = no visible symptoms to 5 = completely wilted or dead. Figures listed are average of 12 plants observed at 14 days after transplanting.

3주씩 채취하여 접종된 균주의 밀도를 조사하였다. 세균밀도 조사방법은 Chen의 방법¹⁾에 따라 한천 증충법에 의하였으며, 지표균주인 Y9균주에 대하여 발육저지원을 형성하는 균총의 수를 조사하였다.

40주씩 난피법 3반복으로 황색종 개량멸칭 표준경 작법에 따라 이식하였으며, 수확이 끝나는 7월 하순까지 6등급으로 발병정도를 나누어 조사하였다.

세균성마름병 방제효과 조사

가식상에 심겨진 담배의 뿌리주변에 세균현탁액 (10^9 cfu/ml)을 주당 5ml씩 본포로 이식하기 하루 전 및 배토할 때에 각각 토양관주하였다. 처리별

결과 및 고찰

비병원성 bacteriocin 생성균주 선발

Table 2. Number of colonies of avirulent bacteriocin-producing isolates of *Pseudomonas solanacearum* detected from the roots of tobacco plants inoculated with same bacteria.

Isolate	Tobacco cultivar	Number of colonies(10^4 cfu/g frash wt.)*			
		0	1	4	8**
Y61-1	NC 82	125 ± 75	148 ± 141	137 ± 103	16 ± 13
	KF 109	120 ± 18	151 ± 63	127 ± 26	7 ± 5
	BY 4	58 ± 36	42 ± 34	8 ± 5	0 ± 0
Y61-2	NC 82	45 ± 40	65 ± 44	94 ± 57	7 ± 5
	KF 109	140 ± 54	182 ± 81	28 ± 16	3 ± 3
	BY 4	152 ± 48	72 ± 78	5 ± 8	0 ± 0
Y61-3	NC 82	125 ± 82	95 ± 55	45 ± 25	4 ± 1
	KF 109	173 ± 63	308 ± 166	52 ± 34	4 ± 2
	BY 4	86 ± 69	113 ± 111	29 ± 32	0 ± 0
Y61-4	NC 82	24 ± 29	69 ± 78	51 ± 36	4 ± 3
	KF 109	66 ± 26	152 ± 87	68 ± 53	2 ± 2
	BY 4	37 ± 22	69 ± 67	29 ± 40	4 ± 4
Y95-1	NC 82	142 ± 54	183 ± 178	29 ± 14	3 ± 0
	KF 109	87 ± 95	107 ± 113	181 ± 205	6 ± 4
	BY 4	158 ± 53	132 ± 110	29 ± 21	1 ± 1

* Tobacco roots were dipped in the bacterial suspension(10^9 cfu/ml) for 30 min prior to transplanting to soil. Whole root systems were washed in running water for 1 min. The roots were ground in glass tissue grinder. 0.5 ml of each root extract suspension was plated on the TZC agar medium before pouring 5 ml of melted 1.5% water agar on the agar surface. After inoculation, 4 ml of melted 0.7% water agar mixed with *P. solanacearum* strain Y-9 was poured over the agar surface. After additional incubation, *P. solanacearum* like colonies with inhibition zone were counted.

Values are means ± standard deviations of three tobacco plants.

** Weeks after root dipping in the bacterial suspension.

Y61균주에서 재분리된 4개 균주가 4개 지표균주 모두에 대하여 15 ~ 29mm 직경의 발육저지원을 형성하였으며, 이 4개 균주와 일부 지표균주의 발육을 억제시킨 2균주가 접종된 담배에서는 접종 3주 후 까지 아무런 병징을 발견할 수 없었다(표 1). 따라서 이 6개 균주는 비병원성 bacteriocin 생성균주로 인정되었다. 또한 Y9균주는 Y95-1균주를 제외한 모든 균주가 생성한 bacteriocin에 대하여

감수성이었기 때문에 bacteriocin 생성균주 검출을 위한 지표균주로 적합할 것으로 생각되었다.

담배뿌리 및 식물체 내 세균의 생육

담배에 접종된 대부분의 비병원성 bacteriocin 생성균주들의 밀도변화를 조사한 결과 뿌리에서는 접종후 1 ~ 2개월 이내에, 줄기에서는 1개월 이내에 급속히 감소되었으며, 이러한 감소현상은 뿌리

Table 3. Number of colonies of avirulent bacteriocin-producing isolates of *Pseudomonas solanacearum* detected from the stems of tobacco plants inoculated with the same the bacteria.

Isolate	Tobacco cultivar	number of colonies(10^4 cfu/g fresh wt.)*		
		1	4	8**
Y61-1	NC 82	70 ± 60	4.7 ± 4.2	2.5 ± 1.2
	KF 109	180 ± 70	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.4
	BY 4	70 ± 80	0.7 ± 0.6	0.0 ± 0.0
Y61-2	NC 82	130 ± 110	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.3
	KF 109	60 ± 60	0.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0
	BY 4	50 ± 50	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0
Y61-3	NC 82	180 ± 170	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.5
	KF 109	110 ± 100	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	BY 4	180 ± 110	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Y61-4	NC 82	430 ± 40	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2
	KF 109	160 ± 30	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	BY 4	40 ± 10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Y95-1	NC 82	140 ± 80	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.4
	KF 109	670 ± 470	3.1 ± 3.2	0.0 ± 0.0
	BY 4	180 ± 120	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2

* Tobacco roots were dipped in the bacterial suspension(10^9 cfu/ml) for 30 min prior to transplanting to soil. After sterilization in 7% sol. of sodium-hypochloride for 1 min, each tobacco stem was ground in mortar. 0.5ml of each stem extract suspension was plated on the TZC agar medium before pouring 5ml of melted 1.5 water agar on the agar surface. After inoculation, 4ml of melted 0.7% water agar mixed with *P. solanacearum* strain Y-9 was poured over the agar surface. After additional incubation, *P. solanacearum* like colonies with inhibition zone were counted.

Values are means ± standard deviations of three tobacco plants.

** Weeks after root dipping in the bacterial suspension.

에서 보다 줄기에서 더 심하였다(표 2,3). 그러나 Y61-1균주의 밀도는 담배품종 NC82 및 KF109의 뿌리와 줄기 모두에서 접종 후 8주까지 다른 균주에 비하여 높게 검출되었다. 또한 Y61-2균주는 NC82 품종의 줄기에서, Y61-4균주는 BY4의 뿌리에서, Y91-1균주는 KF109의 뿌리에서 각각 그 밀도가 높게 유지되었다. 박 등⁹⁾은 같은 방법으로 13개의 비병원성 bacteriocin 생성 균주를 3품종의 담배에 각각 접종한 후 접종된 균주의 밀도변화를 조사한 결과, 균주와 품종의 조합에 따라 각각 다른 밀도 변화를 보였다고 하여 이 시험결과와 같은 경향이 있음을 보고하였다. 이러한 결과는 재배품종에 적합한 균주를 선택하면 처리된 균주의 밀도를 효과적으로 유지할 수 있음을 보여준다.

담배 세균성마름병 방제효과

Y61-1균주 처리에 의하여, NC82 품종과 KF109 품종의 경우에는 무처리 담배에 비하여 각각 58%와 27%의 세균성 마름병 방제효과를 보였다. 그러나 감수성 품종인 BY4의 경우에는 그 처리효과가 인정되지 않았다(표 4). 따라서 세균성마름병에 대한 저항성이 강한 품종일수록 Y61-1균주 처리에 의한 병 방제효과도 높게 나타나는 경향이였다. 박 등^{8,9)}은 발병이 심한 포장에서는 감수성 품종인 BY4나 Hicks의 경우에 비병원성 균주나 bacteriocin 생성 균주 처리에 의한 병 방제효과를 얻을 수 없었으며, 병 피해가 적은 포장에서는 무처리 담배의 발병율이 낮았기 때문에 저항성 품종인 NC82에서 이들 균주처리에 의한 방제효과가 나타나지 않았다고 하였다. 이러한 결과를 종합할 때, 병원균에 의한

Table 4. Disease progress of bacterial wilt of the tobacco plants treated with four avirulent bacteriocin-producing strains of *P. solanacearum* in field naturally infested with the pathogen.

Tobacco cultivar	Isolate treated*	Disease severity**					
		20/June	27	3/July	10	18	24
NC 82	Y 61-1	0.04	0.04	0.11	0.19	0.88	1.58 a***
	Y 61-2	0.14	0.22	0.36	0.69	2.08	3.09 bc
	Y 61-3	0.13	0.24	0.34	0.78	2.68	3.70 c
	Not treated	0.11	0.20	0.27	0.83	2.79	3.76 c
KF 109	Y 61-1	0.14	0.14	0.20	0.42	1.88	2.98 ab
	Y 61-2	0.31	0.51	0.61	1.17	2.87	4.20 c
	Y 61-3	0.29	0.36	0.80	1.67	3.44	4.18 c
	Not treated	0.10	0.26	0.30	0.84	3.23	4.08 c
BY 4	Y 61-1	0.38	0.50	0.72	1.43	3.22	4.10 c
	Y 61-2	0.52	0.72	0.92	1.79	3.39	3.84 c
	Y 61-3	0.32	0.74	0.87	1.59	3.42	4.84 cd
	Not treated	0.80	1.20	1.48	2.39	4.19	4.91 d

* Five milliliter of the bacterial suspension(10^9 cfu/ml) was poured onto the root zone of each 10-wk-old tobacco seedling on 1 day before transplanting to the field and on hilling time, respectively.
 ** Disease index ranged from 0 = no visible symptom to 5 = completely wilted or dead. Values are means of five replicates. Each replicate consists of 40 tobacco plants.
 *** Duncan's multiple range test. Same letters mean no significant difference(P=0.05).

포장의 오염도에 따라 적절한 저항성 품종을 선택하는 것도 비병원성 bacteriocin 생성균주 처리에 의한 병 방제효과를 높이기 위해 매우 중요하다고 생각된다.

이 등^{14, 15)}은 비병원성 *P. solanacearum*이 식물체 내에 침입하여 세균성마름병균의 침입 및 증식을 억제할 수 있다고 하였고, 박 등⁹⁾도 비병원성 bacteriocin 생성균주의 담배뿌리 및 줄기내 밀도가 병 방제효과와 밀접한 관계가 있다고 하였다. 이 시험에서 병 방제효과가 인정된 Y61-1균주는 다른 2균주에 비하여 담배뿌리 및 줄기 속에서의 밀도가 높았기 때문에 박 등의 결과와 같은 경향이 인정되었다. 따라서 비병원성 bacteriocin 생성균주를 이용한 담배 세균성마름병 방제효과를 높이기 위해서는 담배근권 및 줄기에서 이 세균의 밀도를 높여줄 수 있는 방안이 강구되어야 할 것이다.

결 론

담배 세균성마름병균에 대해 생육억제 효과가 있는 비병원성 bacteriocin 생성균주 (*Pseudomonas solanacearum*)들을 선발하였다. 이 균주들을 본포로 담배를 이식하기 하루 전 및 배토할 때 담배 근권토양에 처리한 결과, Y61-1균주가 처리된 담배에서 품종에 따라 27~58%의 세균성마름병 방제효과를 얻을 수 있었다. 이 균주는 담배뿌리 및 줄기 속에서 다른 균주에 비해 오랫동안 높은 밀도를 유지하는 것으로 조사되었다. 따라서 담배의 근권 및 식물체 내에서 이 세균의 밀도를 높여줄 수 있는 방안이 강구된다면 더욱 효과적으로 세균성마름병을 방제할 수 있을 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Chen, W. Y. Ph. D. Thesis, Dept. of Plant Pathol., NC State Univ., Raleigh., p. 68 (1981)

2. Chen, W. Y. and E. E. Echandi. Plant Pathol. 33 : 245-253(1984)
3. Chen, W. Y. E. Echandi and H. W. Spurr, Jr. "Pro. 5th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria." pp. 482-492. Call. Columbia(1981)
4. Cupples, D. A., R. S. Hanson and A. Kelman. J. Gen. Microbiol. 109 : 295-303 (1978)
5. Graham, T. L., L. Sequeira and T. R. Huang. Appl. and Environ. Microbiol. 34 : 424-432(1977)
6. Kerr, A. Plant Disease 64 : 24-30(1980)
7. Obukowicks, M. and G. S. Kennedy. Physiol. Plant Pathol. 18 : 339-344(1981)
8. 박은경, 김정화, 손준수, 김상석, 이영근, 오명희, 강여규. "담배연구보고서 : 경작분야 육종 및 환경편". pp. 269-400. 한국인삼연초연구소(1986)
9. 박은경, 김정화, 손준수, 이영근, 오명희, 강여규. "담배연구보고서 : 경작분야 육종 및 환경편". pp. 161-263. 한국인삼연초연구소 (1988)
10. Rathmell, W. G. and L. Sequeira. Physiol. Plant Pathol. 5 : 65-73(1975)
11. Sequeira, L. Ann. Rev. Plant Pathol. 37 : 51-79(1983)
12. Sequeira, L., G. Garrd and G. A. DeZoeten. Physiol. Plant Pathol. 10 : 43-50(1977)
13. 田中 博, 宇都宮 담배試報. 21 : 1-66(1985)
14. 이영근, 김정화, 박원홍. 한식병지. 2 : 114-120(1986)
15. 이영근, 민태기, 박원홍. 한식병지. 3 : 203-209(1987)

N. africana 의 감자바이러스 Y 엽맥괴저 계통에 대한 저항성의 유전

금완수, 정윤화, 정석훈, 최상주, 이승철

한국인삼연초연구소 경작시험장

Inheritance of Resistance to Potato Virus Y Vein-necrosis Strain of *N. africana*

W. S. Keum, Y. H. Chung, S. H. Jung, S. J. Choi and S. C. Lee

Suwon Agronomy Experiment Station, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, P. O. Box 59, Suwon, 440-600, Korea

ABSTRACT

A program was initiated to transfer potato virus Y vein-necrosis strain resistance from *N. africana* to *N. tabacum*. The F_1 plants between the above species were self-sterile, but all amphidiploid plants from the F_1 plants and backcrossed flowers, that is, the *N. tabacum* flowers crossed with amphidiploid were self-fertile. The parent, amphidiploid plants of F_1 , F_2 population of the amphidiploid and the backcrossed generation were screened for a resistance of potato virus Y vein-necrosis strain isolated in Korea.

The Chi-square values for the F_2 population of the amphidiploid and the backcrossed generation fitted 35 : 1 and 5 : 1 ratios of resistant to susceptible for the potato virus Y vein-necrosis strain, respectively. Therefore, it was found that the resistance of *N. tabacum* for the potato virus Y vein-necrosis strain was controlled by a single dominant gene.

서 론

감자 바이러스 Y는 세계적으로 여러 나라에서 연초의 중요한 병으로 알려져 있다.⁶⁾ 우리 나라에서도 지역에 따라서는 이 병으로 인한 피해가 크다¹¹⁾. 감자 바이러스 Y를 매개하는 진딧물은 잡초

나 여러 가지 다른 작물에서도 서식 또는 월동함으로써 매개원을 없애는 것은 매우 어렵다.⁶⁾ 또한 개개 포장에서 진딧물을 약제로 방제함으로써 감자 바이러스 Y발생을 감소시키기는 어렵다는 보고도 있다.¹²⁾ 따라서 감자 바이러스 Y의 가장 효과적인 방제 방법은 저항성 품종 육성이다.

*N. africana*의 감자바이러스 Y 엽맥괴저 계통에 대한 저항성의 유전

N. tabacum 종(種)내의 감자 바이러스 Y의 저항성원으로는 Vigin A Mutant(VAM)가 널리 이용되어 NC 744²⁾, TN 86⁸⁾ 등의 감자 바이러스 Y 저항성 품종이 육성되었으며, 이 저항성은 단일 열성인자에 의하여 지배된다.⁵⁾ 병저항성이 단일인자에 의하여 지배될 때 그 저항성은 급격히 와해될 가능성이 있다.^{3) 13)} 이에 대비하기 위해서는 여러 가지 다른 저항성의 모색과 도입이 필요하다. Lucas등⁷⁾은 *N. africana*가 감자 바이러스 Y에 대하여 변형형 저항성을 가지고 있다고 하였다.

본 연구는 *N. africana*의 감자 바이러스 Y 저항성을 *N. tabacum*에 도입하는 과정에서 이 저항성의 유전 양상을 구명하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

공시재료는 교배친인 *N. tabacum*(CV. NC 82)와 *N. africana*, 그 F₁, F₁의 복2배체, 복2배체에서 채종한 F₂집단 그리고 복2배체에 NC 82를 여교배하여 채종한 집단을 사용하였다. 복2배체 육성을 위한 F₁의 염색체 배가는 Kasperbauer와 Collins⁴⁾의 조직배양 방법으로 하였다.

감자 바이러스 Y의 저항성 검정을 위한 식물재료는 1989년 10월 15일 온실에서 파종하여, 12월 2일에 가식하였고, 12월 22일 풋트(직경 12 cm, 높이 10 cm)에 이식하였다. 접종원인 감자바이러스 Y 괴저계통¹⁰⁾은 병리실험실에서 분양받아 사용하였다. 균주를 담배 모자이크 바이러스에 저항성인 Burley 21에 접종한 20일 후에 이병엽을 채취하여 살균된 유발에서 phosphate buffer(0.01 M, pH 7.0)용액을 이병엽 1g당 5 ml의 비율로 넣어 분쇄한 후 착즙하는 방법⁹⁾으로 접종원을 만들었다. 감자

바이러스 Y의 접종은 12~13매 묘의 최대엽과 그 상위엽에 착즙한 즙액을 600 mesh의 carborundum으로 도말 접종¹¹⁾하고 잠시후 물로 씻어 주었다. 저항성과 이병성은 접종 4주 후에 나타난 병징에 의하여 구분하였다.

결과 및 고찰

표 1은 교배친인 *N. tabacum*(CV. NC 82)과 *N. africana*의 중간교배 세대에 있어서의 임성 및 채종한 종자의 발아율을 나타낸 것이다. NC 82와 *N. africana*를 교배하여 얻은 종자를 파종한 F₁식물중에서 잡종으로 구분된 식물은 불임이었다. 잡종 F₁식물의 엽색체를 배가한 복2배체에서는 종자량은 적었으나, 그 종자의 발아율은 양호한 편이었다. 또한 NC 82를 모본으로 복2배체와 교배한 BC₁세대 식물은 종자량이 상당히 많은 편이었으나, 그 종자의 발아율은 매우 낮았다.

교배친인 NC 82와 *N. africana*, 그 F₁, F₁의 복2배체, 복2배체에서 채종한 F₂집단 그리고 NC 82와 복2배체의 여교배로 채종한 집단을 각각 공시하여 감자 바이러스 Y 엽맥괴저 계통에 대한 저항성 검정 및 Chi-square검정을 한 결과는 표 2 및 3과 같다.

이병성 교배친인 NC 82는 감자 바이러스 Y 엽맥 괴저계통을 접종했을 때 공시된 모든 개체의 엽맥이 흑갈색으로 변했으나, 저항성인 *N. africana*의 경우에는 아무런 병징이 나타나지 않았다(표 2).

F₁과 F₁의 복2배체에서도 *N. africana*와 마찬가지로 엽맥 괴저계통의 접종으로 아무런 병징이 나타나지 않았다. 복2배체를 자식하여 채종한 F₂세대에서는 저항성과 이병성 개체의 관찰치가 저항성의 유전이 단일 우성인자에 의하여 지배될 때의

Table 1. Fertility, and seed amount and germination of interspecific hybrids *N. tabacum*(CV. NC 82) × *N. africana*

Hybrid	Fertility(F)	Seed amount	Germination
F ₁ (NC 82 × <i>N. africana</i>)	Non-F		
4n {F ₁ (NC 82 × <i>N. africana</i>)}	F	Small	Good
NC 82 × 4n{F ₁ (NC 82 × <i>N. africana</i>)}	F	Medium	Low

Table 2. Chi-square test potato virus Y vein-necrosis strain resistance in F₁ hybrid and F₂ amphidiploid of *N. tabacum* (CV. NC 82) × *N. africana*

	Resistant	Susceptible	Total
NC 82	0	10	10
<i>N. africana</i>	10	0	10
F ₁ (NC 82 × <i>N. africana</i>)	10	0	10
4n{F ₁ (NC 82 × <i>N. africana</i>)}	10	0	10
F ₂ {4n(NC 82 × <i>N. africana</i>)}			
Observed (O)	193	8	201
Expected (E)	195.4	5.6	201
$\frac{(O - E)^2}{E}$	0.03	1.01	X ² = 1.04

X² = 0.05(1) = 3.84

이론적 분리비인 35 : 1과 비교할 때 Chi-square의 값이 1.04로 X² = 0.05(1) = 3.84보다 적은 값을 나타내어 관찰치는 이론치와 잘 일치되었다.

NC 82와 F₁의 복2배체를 교배한 1차 여교배 세대에서도 표 3에서와 같이 저항성과 이병성 개체의 관찰치가 저항성의 유전이 단일 우성 우성인자에 의하여 지배될 때의 분리비인 5 : 1과 비교할 때 Chi-square의 값이 1.67로써 X₂ = 0.05(1) = 3.84보다 적은 값을 나타내어 관찰치는 이론치와 잘 일치 되었다. Virgin A mutant의 감자 바이러스 Y에 대한 저항성이 단일 열성인자에 의하여 지배되는⁵⁾

반면에 *N. africana*의 이 병에 대한 저항성은 위의 실험 결과에서와 같이 단일 우성인자에 의하여 지배된다. 두 저항성이 모두 단일인자에 의하여 지배되는 것은 같으나 병저항성이 급격히 와해될 가능성에 대비하기 위해서는 여러가지 다른 저항성원을 개발해 둘 필요가 있다. 뿐만 아니라, *N. africana*의 감자 바이러스 Y에 대한 저항성은 우성인자에 의하여 지배됨으로 이 저항성을 *N. tabacum*에 도입한 유전자원이 개발되면 Virgin A mutant에서 도입된 저항성원을 이용할 때보다 육종경과가 빠르고 또한 F₁품종 육성에도 이용될 수 있는 장점이

Table 3. Chi-square test for potato virus Y vein-necrosis strain resistance in backcrossed generation of *N. tabacum* (CV. NC 82) and 4n {*N. tabacum* (CV. NC 82) × *N. africana*}

	Resistant	Susceptible	Total
NC 82	0	10	0
4n{F ₁ (NC 82 × <i>N. africana</i>)}	10	0	10
NC 82 × 4n{F ₁ (NC 82 × <i>N. africana</i>)}			
Observed (O)	195	48	243
Expected (E)	202.5	40.5	243
$\frac{(O - E)^2}{E}$	0.278	1.389	X ² = 1.67

X² = 0.05(1) = 3.84

있을 것으로 생각된다.

결 론

*N. africana*의 감자 바이러스 Y 엽맥괴저계통 (vein necrosis, PVY-VN)에 대한 저항성을 연초 재배품종에 도입하기 위하여 중간교배 및 PVY-VN에 대한 저항성의 유전양상을 조사하였다.

N. tabacum(CV. NC 82)과 *N. africana*를 교배하여 얻은 F₁잡종은 불임이었으며 그 엽색체를 배가하여 얻은 복2배체는 임성이었고 소량의 종자를 얻을 수 있었다.

N. tabacum(CV. NC 82) × *N. africana*의 F₁과 그 복2배체는 PVY-VN에 대하여 저항성이었으며, 복2배체를 자식하여 얻은 F₂세대 및 *N. tabacum*(CV. NC 82)와 복2배체를 교배한 BC₁세대에서의 저항성과 이병성의 분리비는 저항성이 단일 우성 인자에 의하여 좌우될때 이론적인 분리비인 35 : 1 및 5 : 1에 각각 잘 일치되었다.

참 고 문 헌

1. Agrios, G. N. "Plant Pathology". Academic Press, New York, U. S. A. (1978).
2. Chaplin, J. F., L. G. Burk, G. V. Gooding and N. T. Powell. Crop Sci. 20 : 677(1980).
3. Edgington, L. V., R. A. Martin, G. C. Bruin and I. M. Parsons. Plant Dis. 64 : 19-23(1980).

4. Kasperbauer, M. J. and G. B. Collins. Crop Sci. 12 : 98-101(1972).
5. Koelle, G. Zuchter 31 : 71-72(1961).
6. Lucas, G. B. "Disease of Tobacco" 3rd ed. P. 457-469, Biological Consulting Associates, Raleigh, N. C. U. S. A. (1975).
7. Lucas, G. B., G. V. Gooding, Jr., J. N. Sasser and D. V. Gerstel. Tob. Sci. 24 : 141-142(1980).
8. Miller, R. D. Crop Sci. 27 : 365-366(1987).
9. Noordam, D. "Identification of plant viruses methods and experiments." P. 21. Centre for Agricultural and Documentation, Wagenigen, the Netherland(1973).
10. 박은경, 부경생. 한국인삼연초연구소 담배연구보고서(경작분야 환경편) : 3-15(1973).
11. 박은경, 김정화. 한국인삼연초연구소 담배연구보고서(경작분야 환경편) : 235-250(1982).
12. Reagen, E. E., G. V. Gooding, Jr. and G. G. Kennedy. J. Econ. Entomol. 72 : 538-540(1979).
13. Van der Plank, J. E. "Principles of plant infection." p. 216, Academic Press, New York, U. S. A. (1975).