

組織培養에 의한 除草劑 Butachlor와 Bialaphos에
對한 담배의 品種間反應

裴允珠* · 金吉雄* · 鄭亨鎮**

Varietal Response of Tobacco Plants Through Tissue
Culture to Butachlor and Bialaphos Herbicides

Bae Y.Z.,* K.U. Kim* and H.J. Jeong**

ABSTRACT

This study was carried out to determine effect of butachlor [*N*-(*butoxymethyl*)-2-*chloro*-*N*-(2,6-diethylphenyl) acetamide] and bialaphos [*2-amino*-4(*hydroxy*)(*methyl phosphionyl*) *butyryl-alanylalanine sodium salt*] on the germination of tobacco seed, induction and growth of callus from tobacco. Further, fatty acids and ammonia content of tobacco calli were determined. Bialaphos had no effect on tobacco seed germination, but the growth of seedling was markedly affected by an application of 10 ppm bialaphos. However, regardless of varieties tested, tobacco seed germination was completely inhibited by 5×10^{-4} M of butachlor. At an application of 5×10^{-5} M butachlor, tobacco seeds were to some extent germinated and showed further growth. Hyangcho among varieties tested, showed the most tolerant response to butachlor. In induction of callus from various tobacco varieties and their growth, aromatic type of tobacco varieties exhibited the most tolerance against bialaphos. However, no distinct varietal differences were determined in the treatment of butachlor. The major fatty acids identified in tobacco calli were palmitic, oleic and linoleic acid. No marked difference in terms of fatty acids was observed among tobacco varieties used, but it was observed that there was the higher ratio of quantity in unsaturated fatty acids over saturated one. Bialaphos treatment accumulated about 9 times higher ammonia content than that of the untreated control, giving an evidence that bialaphos might inhibit glutamine synthetase activity.

Key words : *Butachlor*, *bialaphos*, *callus growth rate*, *fatty acid*, *ammonia*.

緒 言

除草劑에 대한 作物의 耐性 品種育成은 除草劑 處理로 인한 藥害輕減 및 雜草防除範圍 擴大 등에 매우 有利하며 특히 非選擇性 除草劑에 대한 耐性 品種育成은 效果的인 除草劑의 使用을 가능케 한다. 이러한 耐性을 지닌 作物을 選拔, 育成하기 위해 組

織培養이 많이 이용되고 있다. Callus의 誘導 및 分化가 잘 되는 담배를 使用하여 metribuzin, picloram, glycin, 4-oxalysine, amitrole, methionine, sulfoximine, glyphosate 除草劑 등에 대한 耐性植物體 選拔 및 cell-line 選拔에 관한 많은 研究結果^{1,2,3,4,5,6,7)}가 報告되고 있다. 특히 植物組織培養은 somaclonal variation의 誘導로 새로운 遺傳의 多樣性的의 供給原을 提供하는 이점¹⁾이

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

** 安東大學 生物科 Dept. of Biology, Andong National College, Andong, Kyungbuk, Korea.

있는 반면 光合成을 抑制하는 metribuzin과 같은 除草劑는 幼苗에 나타난 抑制效果가 callus 에서는 나타나지 않기 때문에 組織培養이 耐性植物體 選拔法으로 利用되기 어렵다.⁶⁾ 그러므로 組織培養을 통한 除草劑 耐性 cell-line 選拔에는 非光合成 抑制 除草劑를 使用하는 것이 有利할 것이다.

本 實驗은 非選擇性 除草劑로 glutamine synthetase의 酵素作用을 抑制하는 bialaphos^{8,9,10)}와 蛋白質代謝를 抑制하는 butachlor¹¹⁾에 대한 담배 品種間의 反應差를 種子로부터 callus 誘導 및 callus 生長을 比較하여 이들 除草劑에 대해 耐성을 가진 品種을 選拔하고 callus 内の 脂肪酸 構成과 bialaphos의 除草作用과 關係하여 ammonia含量 등의 檢定을 통해 耐性植物體를 選拔, 育成하는데 필요한 基礎資料를 얻고자 本 實驗을 遂行하여 얻어진 結果를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

供試된 담배品種은 黃色種인 NC 82, NC 2326, BY 4, Burley 種인 Burley 21, 香臭味種인 KA 101, Hyangcho, Xanthi-Basma 등의 種子와 이들을 生育시킨 잎자루部分을 材料로 利用하였으며 除草劑는 butachlor [N-(butoxymethyl)-2-chloro-N-(2,6-diethylphenyl)acetamide]과 bialaphos [2-amino-4((hydroxy)(methyl)phosphonyl)butyryl-alanylalanine sodium salt]를 使用하였다.

實驗 1. Bialaphos와 butachlor이 담배種子의 發芽 및 生育에 미치는 影響: NC 82 外 5種의 담배種子를 70% ETOH에 1分間 消毒한 後 滅菌蒸溜水로 3回 洗滌하여 hormone이 添加되지 않은 MS培地에 bialaphos 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 100.0 ppm, butachlor 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} M 處理 後 사례當 9粒씩 置床하여 28°C, 光狀態에서 28日間 培養하여 生體重을 測定 比較하였다.

實驗 2. Bialaphos와 butachlor이 callus 誘導 및 增殖에 미치는 影響: 開花할 무렵 담배의 잎자루 組織을 採取하여 70% ETOH와 1% sodium hypochlorite로 殺菌한 後 IAA 11.5 μ M, Kinetin 1 μ M이 添加된 MS培地에 bialaphos 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 ppm, butachlor 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M을 處理하여 사례當 組織 1~1.5 mm의 크기로 5片씩 置床하였다. 培養條件은 23°C, 暗狀態

로 置床 後 30日째 callus 誘導量을 測定하였다. Callus 增殖에 미치는 除草劑의 影響을 究明하기 위해 2,4-D 0.75 μ M, kinetin 0.5 μ M 이 含有된 MS培地에 1個月間 增殖시킨 callus를 bialaphos가 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5 ppm, butachlor 10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7.5×10^{-5} , 10^{-4} , 2.5×10^{-4} M 이 處理된 同一한 培地에 사례當 3片씩 40mm을 置床하여 30日 後 生體重을 測定하였다.

實驗 3. 誘導된 callus의 脂肪酸含量과 除草劑 處理時 callus 內에 蓄積된 ammonia含量 分析: 脂肪酸를 測定키 위해 callus 增殖培地(2,4-D 0.75 μ M, kinetin 0.5 μ M)에 1個月間 培養한 callus를 30°C에서 48시간 乾燥시킨 後 10g씩 磨碎하여 使用하였으며 Court와 Hendel의 方法¹²⁾으로 脂肪酸를 抽出하여 GLC로 同定하였다. Ammonia含量을 測定하기 위해 callus 增殖培地에 bialaphos 5ppm과 butachlor 5×10^{-4} M을 處理하여 培養時 生長을 멈춘 褐色의 callus 1g을 採取하여 Nikolin과 Butmir의 方法으로 抽出, 發色시켜 spectrophotometer · 670 nm에서 檢量하였다.

結果 및 考察

除草劑와 담배種子 發芽 및 生長: 表 1은 bialaphos와 butachlor이 담배 品種間 發芽 및 生育에 미치는 影響을 나타낸 것으로 bialaphos의 경우 無處理에 比하여 全品種이 0.5 ppm에서 42.7%~31.7%, 10 ppm에서 3~7.1% 범위의 生長을 보여 濃度間에 差異가 있으나 低濃度에서 濃度가 增加할수록 品種間 反應差는 적었다. 品種間에는 香草가 他品種에 比해 약간의 相對的 耐성을 보였다. Bialaphos 100.0 ppm에서도 發芽는 되었으나 곧 枯死하였다. Butachlor 處理는 品種間에 큰 差異를 보였는데 香草의 경우 5×10^{-5} M에서 無處理보다 生長이 增加된 반면 NC 82는 7.7%로 크게 抑制되어 香草가 이 濃度에서 耐性으로 나타났다. Butachlor 10^{-4} M 處理時 香草를 除外하고는 全供試品種이 發芽가 되지 않았고 5×10^{-4} M에서는 供試品種 모두 發芽가 되지 않았다(表 1). 金¹³⁾ 등에 의하면 벼品種에 butachlor 10^{-4} M을 處理했을때 약간의 發芽가 되었으나 10^{-3} M에서는 供試品種에 關係없이 發芽가 되지 않았다는 報告와 本 實驗의 結果는 유사하다고 思料된다.

Table 1. Effect of herbicides on the germination of various tobacco seeds and their growth¹⁾.

Variety Conc.	Bialaphos (ppm)						Butachlor (Mol)			
	0	0.5	1	5	10	100	10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴
.....Growth rate (%) ²⁾										
NC 82	100	42.4	31.5	4.5	3.0	.	104.2	7.7	.	.
NC 2326	100	33.8	14.5	7.6	4.3	.	230.1	43.4	.	.
BY 4	100	38.2	28.0	17.2	7.1	.	99.0	21.2	.	.
Burley 21	100	34.5	18.7	9.2	5.0	.	226.0	89.4	.	.
KA 101	100	31.7	22.8	7.9	3.5	.	53.9	51.1	.	.
Hyangcho	100	42.7	41.6	18.6	6.9	.	419.3	116.6	6.5	.

¹⁾ Determined at 30 days after inoculation, average of 45 seedlings.

²⁾ % of untreated control (fresh weight)

Table 2. Effect of herbicides on the calli induction from various tobacco petioles.

Variety Conc.	Bialaphos (ppm)					Butachlor (M)				
	0	0.1	0.5	1	5	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	
.....Induction rate % ¹⁾										
NC 82	100	35.8	5.2	*	.	93.6	20.9	18.5	.	.
Burley 21	100	33.8	*	.	.	85.6	22.7	5.8	.	.
KA 101	100	94.3	27.7	13	.	97.7	32.8	8.4	.	.
Xanthi-Basma	100	45.0	12.4	5.2	.	95.0	27.4	7.5	.	.

¹⁾ $\frac{\text{fresh weight of calli in herbicides treated}}{\text{fresh weight of calli in herbicides untreated}} \times 100$

²⁾ * means a little induction.

除草劑가 callus 誘導 및 增殖에 미치는 影響 : 表 2는 除草劑가 담배로부터 callus 誘導에 미치는 影響을 나타낸 것으로 butachlor callus 誘導에 뚜렷한 品種間 差異는 보이지 않았으나 10⁻⁶ ~ 10⁻⁵ M 處理區에서 香嗅味種인 KA 101과 Xanthi-Basma가 다른 品種에 비해 誘導率이 다소 높았고 10⁻³ M에서는 供試品種 모두에서 callus가 誘導되지 않았으며 10⁻⁴ M에서 일부 誘導는 되었으나 곧 變色되었다. 金等¹⁴⁾에 의하면 피種子로부터 callus 誘導時 butachlor 低濃度에서 種類間에 差異가 있다고 報告한 것과 비슷한 結果로 간주된다. Bialaphos 處理時 0.1 ppm에서는 callus 誘導率이 KA 101 94.3%를 除外하고는 모두 50% 程度였고 1.0 ppm 處理時 KA 101 13.0%, Xanthi-Basma 5.2%의 誘導率을 나타낸 반면 NC 82와 Burley 21은 誘導 조차 되지 않아 香嗅味種인 KA 101과 Xanthi-Basma가 다른 品種에 비해 bialaphos에 相對的 耐性을 갖고 있을 것으로 思料된다(그림 1).

表 3은 除草劑가 callus 增殖에 미치는 影響을 나타낸 것으로 bialaphos의 경우 1.0 ppm 處理時 黃色種인 NC 2326 4.1%, BY 4 3.7%, Burley 21 3.0% 程度 增殖되어 生長이 微微한 반면, 香嗅

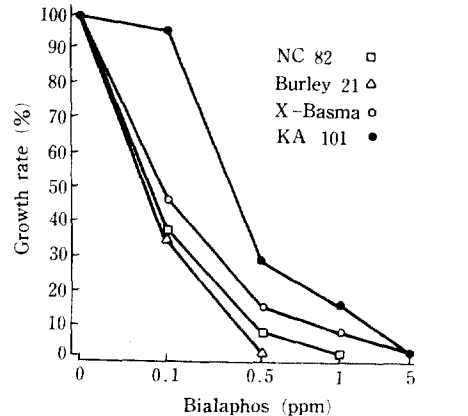


Fig. 1. Effect of bialaphos on the calli induction from various tobacco petioles.

味種인 香草는 27.3%의 生長을 보여 品種間에 差異를 나타냈다. Bialaphos 低濃度인 0.25, 0.5, 0.75 ppm에서도 비슷한 傾向을 보여 주어 bialaphos에 대해 黃色種이나 Burley種 보다 香嗅味種이 耐性을 갖고 있을 것으로 思料된다(그림 2). Butachlor 處理時 品種間에 뚜렷한 差異는 나타내지 않았으나, 低濃度에서 黃色種과 Burley種의 生長이 香嗅味種 보다 다소 強함을 보여 bialaphos와는 相異한 反應을 나타냈다. Butachlor 10⁻⁴ M에

Table 3. Effect of herbicides on the growth of various tobacco calli.

Variety Conc.	Bialaphos (ppm)						Butachlor (Mol)					
	0	0.25	0.5	0.75	1	2.5	10^{-5}	2.5×10^{-5}	5×10^{-5}	7.5×10^{-5}	10^{-4}	2.5×10^{-4}
Growth rate % ¹⁾											
NC 82	100	27.2	15.1	8.5	7.3	1.6	61.9	36.1	10.3	5.7	2.9	1.2
NC 2326	100	34.6	14.5	9.6	4.1	3.7	48.0	49.3	8.1	8.7	4.5	2.1
BY 4	100	45.6	18.1	7.5	3.7	2.7	43.9	52.9	4.6	3.7	2.1	1.7
Burley 21	100	11.8	5.5	3.2	3.0	2.5	50.1	29.1	15.8	2.6	2.7	1.9
KA 101	100	31.3	20.6	16.6	8.8	2.6	50.6	19.1	4.7	10.9	4.2	1.7
Hyangcho	100	66.4	51.9	36.8	27.3	4.1	38.5	28.1	14.2	10.3	4.3	1.3
Xanthi Basma	100	61.4	32.3	18.6	18.4	2.2	55.2	24.3	9.9	9.3	5.9	3.0

¹⁾ $\frac{\text{fresh weight of calli in herbicide treated}}{\text{fresh weight of calli in herbicide untreated}} \times 100$

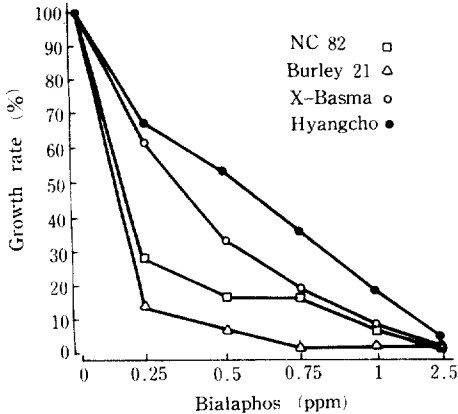


Fig. 2. Effect of bialaphos on the growth of various tobacco calli.

서는 供試品種 대부분이 2.1~5.9%의 callus 生長을 나타내고 2×10^{-5} M 濃度에서는 call의 生長이 微微했다(表 3). 이와같은 結果는 高濃度の bialaphos 處理區에서는 品種間에 選擇性이 없음을 말해 주고 있다.

Callus 内の 脂肪酸과 除草劑 處理時 ammonia 含量의 檢定: 除草劑 吸收 및 移行에 影響을 미치는 細胞膜의 主成分인 脂肪酸 構成을 callus 狀態에서 分析한 結果는 表 4 와 같다. 供試品種에 關係없이 palmitic 酸의 含量이 가장 높았고 다음이 linoleic, oleic 酸의 順이었고 品種間에 뚜렷한 脂肪酸 含量差는 나타나지 않았다. 全 供試品種 共히 不飽和脂肪酸의 含量이 飽和脂肪酸 보다 많은 것이 特徴的이고 品種間의 比率에는 黃色種에서 다소 높았으나 이들과 除草劑에 대한 담배品種間의 callus 生長抑制와의 關係에 대해서는 金후 檢討되어야 할 것으로 思料된다.

表 5는 除草劑 bialaphos 處理時 callus 內에 蓄

Table 4. Comparison of fatty acids content in various tobacco calli.

Variety	Fatty acids				
	16:0	18:1	18:2	Total	zus:zs
mg/g.....				
NC 82	2.89	1.37	2.81	7.07	1.45
NC 2326	3.18	1.73	2.91	7.82	1.46
BY 4	2.36	1.29	1.87	5.52	1.34
Burley 21	3.28	1.86	2.24	7.83	1.25
KA 101	2.39	1.44	1.72	5.55	1.32
Hyangcho	3.01	1.92	2.35	7.28	1.42

¹⁾ 16:0; 18:1; oleic, 18:2; linoleic.

²⁾ zus/zs means Total unsaturated fatty acids/ Total saturated fatty acids.

Table 5. NH₃ content in tobacco callus treated with herbicides¹⁾.

Variety Conc.	Bialaphos	Butachlor	
	0	5 ppm	5×10^{-4} M
ppm/g		
NC 82	81.0	713.0	322.0

¹⁾ Experiment was conducted at the growth chamber with 25c, under dark condition, determined at the 60 days after incubation.

積된 ammonia 含量을 檢定한 것으로 無處理의 ammonia 含量은 生體重 1g 當 81.0 ppm인데 비하여 bialaphos 處理區에는 713.0 ppm, butachlor 處理區에서는 322.0 ppm으로 無處理에 비해 bialaphos 處理때는 9倍 程度의 높은 ammonia가 檢量되었다. 이미 Tachibana, Watanabe, Kaneko 等^{8,9,10)}은 glutamine synthetase의 活性抑制로 ammonia 含量이 增加함과 동시에 glutamine의 含量이 減少된다고 報告하였고, 또 bialaphos 處理後 外部로부터 glutamine을 添加하더라도 bialaphos의 藥害를 輕減시키지 않았다는 事實은 殺草作用의 主原因이 ammonia 蓄積에 의한 것이라고 報告한 바 있다. 本 實驗의 研究 結果로 미뤄보아

callus 狀態에서도 bialaphos 를 處理하면 生長이 抑制되는 것은 ammonia 蓄積에 起因된다고 볼 수 있다.

摘 要

除草劑 butachlor 과 bialaphos 가 담배 種子의 發芽 및 生長, callus 誘導, callus 生長에 미치는 影響을 調査하여 品種間 差異를 比較하였다. 除草劑의 吸收, 移行 및 殺草機構를 究明하기 위해 callus 內의 脂肪酸 과 除草劑 處理時 ammonia 含量을 測定하여 얻어진 結果는 다음과 같다.

Bialaphos 는 全 處理濃度에서 담배의 發芽를 抑制시키지 않아 100.0 ppm 에서도 發芽는 하나 生長은 되지 않았으며 10.0 ppm 에서는 無處理에 비해 10.0% 未滿, 0.5 ppm 에서는 31.7~42.7% 의 生長을 보였고 供試品種 가운데는 香臭味種인 香草가 相對的 耐性を 나타냈다.

Butachlor 5×10^{-4} M 에서는 全 供試品種이 發芽되지 않았으나 5×10^{-4} M 以下에서는 全 品種이 發芽 및 生長을 보였으며 bialaphos 處理區와 마찬가지로 香臭味種인 香草가 他品種에 비해 耐性を 나타냈다.

Butachlor 處理時 callus 誘導 및 增殖에는 담배의 全 供試品種間에 뚜렷한 差가 없었으나 Bialaphos 處理時 KA 101, Xanthi-Basma, 香草等 香臭味種이 他品種에 비해 相對的 耐性を 보인다.

NC82 로부터 誘導된 callus 內에 檢定된 脂肪酸는 palmitic, linoleic 및 oleic 酸 등이었고 飽和 脂肪酸에 對한 不飽和 脂肪酸의 比率이 黃色種에는 다소 높았으며 品種間의 脂肪酸含量에는 현저한 差異가 없었다.

Callus 內의 ammonia 含量은 bialaphos 處理時 9배나 增加되어 ammonia 蓄積이 本 除草劑에 의한 殺草原因이 아닌가 思料된다.

LITERATURE CITED

1. Chaleff, R.S. and R.B. Ray. 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science*, 223 : 1148-1151.
2. Loo Shin-wei., Hoche-pui et al. 1981. 4-oxalysine-resistant mutant from tobacco callus. *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*. 255-263.
3. 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.
4. 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.
5. Hozawa, 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.
6. Ellis, B.E. 1978. Non-differential sensitivity to the herbicide metribuzin in tomato cell suspension cultures. *Can. J. Plant Sci.* 58 : 775-778.
7. Peter, S.C. 1973. Methionine Sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science*, 180 : 1366-1368.
8. 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.
9. Tachibana, K., T. Watanabe et al. 1987. Accumulation of ammonia in plants tested with bialaphos. *J. Pesticide Sci.* 33-37.
10. Tachibana, K. and Kaneko, K. 1986. Development of a new herbicide, bialaphos. *J. Pesticide Sci.* 11 : 297-304.
11. 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.
12. Nikolin, B.A. and H. Butmil. 1974. Colorimetric determination of ammonia in tobacco. *Tob. Sci.* 18 : 10.
13. Kim, K.U. and S.J. Kim. 1986. Varietal tolerance of rice plants to butachlor and simetryne. *Weed Res. Japan*, 31 : 23-24.
14. Kim, K.U. 1985. Herbicide Resistance in plant Tissue Culture. *J. of Weed Science*, Vol. 5(1).

15. Court. A.W. and G.G. Hendel. 1978.
Determinaton of non-volatile organic and fatty
acids in flue-cured tobacco by gas-liquid

chromatography. J. of Chromatographic Sci.
Vol. 16 : 314-317.