

# 光獨立營養細胞를 이용한 새로운 除草劑 選拔法 確立

## II. 담배의 綠化 培養 細胞의 Paraquat 및 Diuron에 대한 反應 徐秀奩 · 金吉雄 · 權純泰\*

### Establishment of a New Herbicides Screening Method Using Photoautotrophic Cultured Cell

#### II. The Responses of Chlorophyllous Cells to Paraquat and Diuron in Tobacco

Suh, S.K., K.U. Kim and S.T. Kwon\*

#### ABSTRACT

This study was conducted to determine the response of newly developed chlorophyllous cells against photosynthesis inhibitory herbicides in LS medium. Inhibition of the growth of the selected chlorophyllous cells in the LS medium containing sucrose 1%, NAA 10<sup>-5</sup> M and BA 10<sup>-6</sup> M under light condition increased as the concentrations of paraquat increased from 10<sup>-6</sup> M to 10<sup>-4</sup> M. The calli died in 10<sup>-4</sup> M paraquat treatment and the inhibition of calli growth was greater when CO<sub>2</sub> was supplied. In the treatment of herbicide diuron, the inhibition of calli growth also increased as the concentrations of diuron increased from 10<sup>-6</sup> M to 10<sup>-3</sup> M and more inhibition was observed at 1% sucrose than 2% sucrose.

Key words : Chlorophyllous cell, paraquat, diuron.

#### 緒 言

최근 組織培養을 통한 新規 化合物의 器內에서 效果 檢定 및 耐性植物體 選拔에 관한 研究가 활발히 進行되고 있는데 callus의 경우 光合成 能力이 없기 때문에 光合成 抑制 除草劑에 대한 檢定 및 耐性 植物體 選拔 研究 및 組織 培養을 응용할 수 없는 단점이 있다.<sup>2)</sup> 光合成 抑制 除草劑는 세계 80억불 除草劑 市場의 50% 이상을 점유하고 있기 때문에 光合成 抑制 除草劑를 器內에서 培養細胞를 통하여 신속하고 간단하게 檢定하는 選拔法이 確立된다면 매우 經濟的인 選拔 方法이 될 것이다.<sup>4)</sup>

시금치 (*Spinacia oleracea*)로 부터 分離된 Thylakoid를 이용하여 光合成중 Hill 反應을 檢

定하는 方法으로 光合成 抑制 除草劑를 選拔하고 있으나 완전한 植物體를 이용하여 選拔한 것과 차이가 많기 때문에 光合成 抑制 除草劑의 選拔에 유익한 方法이 아닌 것으로 간주되어 새로운 方法이 모색되고 있다.<sup>8,9)</sup> 이런 관점에서 보면 葉綠體를 이용하는 것 보다 細胞 수준에서 檢定하면 葉綠體膜이 지닌 短點을 다소 補完하고 植物體를 대상으로 選拔한 것에 더욱 接近되리라 생각되며 進一步한 方法이라 간주된다.<sup>13)</sup>

따라서 光合成作用에 의해 生長이 가능한 光獨立營養細胞가 育成되면 細胞를 이용한 光合成 抑制 除草劑에 대한 耐性植物의 選拔에도 適合하게 利用될 것이다.

光合成 抑制除草劑는 一般的으로 낮은 光合成 率을 지닌 細胞의 生長에는 影響을 미치지 못하는 것으로 알려졌으나, Sato등<sup>10,11)</sup>은 蔗唐의 습

\* 慶北大學校 農科大學 (College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea) 이 論文은 1990年度 韓國科學財團의 基礎 一般 研究費에 의하여 研究되었음

## 結果 및 考察

有量이 아주 낮은 培地에서 培養된 photomixotrophic cell의 效果的인 抑制作用을 究明하였으며,<sup>6)</sup> 光獨立營養細胞가 從屬營養細胞나 photomixotrophic cell 등에 비하여 모든 供試 除草劑에 민감한 反應을 보였다고 報告했다.<sup>11)</sup> 그리고 최근에 Kwak 등<sup>7)</sup>은 우산이끼의 光獨立營養細胞를 利用하여 光合成 抑制 除草劑를 選拔한 有用한 方法을 報告한 바 있다.

따라서 본 研究는 器內에서 光獨立營養細胞를 容易하게 育成하는 方法을 確立하고 獨立營養細胞를 利用한 光合成 抑制 除草劑의 選拔 效果를 檢討하여 器內에서 신속하고 간편하게 新規 化合物을 檢定하여 耐性植物 選拔 方法 確立을 위한 基礎 研究로서 綠化된 callus(chlorophyllous cell)을 利用하여 光合成 抑制 除草劑인 paraquat와 diuron, 植物生長調節劑 및 sucrose가 담배 callus의 誘導 및 生長과 葉綠素 生成에 미치는 影響을 調査하였다.

## 材料 및 方法

本 實驗에 사용된 綠化된 callus(chlorophyllous cell)는 徐 등<sup>12)</sup>의 연구에서 callus 誘導와 葉綠素 形成에 가장 效果的으로 나타난 培地 造成인 NAA  $10^{-5}$  M, BA  $10^{-6}$  M sucrose 1% 含有된 LS 固體培地에서 誘導 시켰으며 同一 培地에서 繼代 培養 한 후 綠色을 유지한 callus를 實驗材料로 使用하였다.

綠化된 callus를 液體 培地에 置床 한 후 5일 間격으로 4번 繼代培養 시킨 후 除草劑 paraquat (1-1-dimethyl-4,4-bipyridinium)  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M, diuron(3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ , 處理한 후 28°C 光狀態에서 100rpm으로 30日 間 抵湯培養 시킨 후 각 溫度별 生體重을 測定하고 葉綠素의 含量을 Arnon<sup>13)</sup>과 Sunderland<sup>13)</sup>의 方法으로 調査하였다.

培養細胞로 CO<sub>2</sub>를 供給하기 위하여 Husemann의 方法<sup>3)</sup>으로 0.4M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+0.6 M KHCO<sub>3</sub>로 buffer를 만들어 플라스크의 下端에는 CO<sub>2</sub> buffer를, 上端에는 培養細胞를 넣는 2단 플라스크를 使用하였다.

綠化된 callus의 光合成 抑制 除草劑에 대한 反應을 調査하기 위하여 가장 效果的으로 나타난 培地 造成 즉 NAA  $10^{-5}$  M, BA  $10^{-6}$  M 및 sucrose 1%가 含有된 LS배지에서 誘導 시켰으며 同一 培地에서 繼代培養시켜 綠化된 細胞(chlorophyllous cell)를 選拔하여 paraquat와 diuron에 대한 反應으로 調査하였다.

綠化된 callus의 光合成 抑制 除草劑에 대한 反應을 보면 paraquat의 濃度가 增加할 수록 buffer를 통한 CO<sub>2</sub>의 供給과 관계없이 生長이 크게 抑制되며  $10^{-4}$  M 처리에서는 완전히 抑制되어 褐變 枯死되었다.

CO<sub>2</sub> 供給에 따른 綠化된 callus의 反應은 paraquat에 더욱 민감한 反應을 보였는데  $10^{-6}$  M 處理區에서 CO<sub>2</sub> 供給時에 64.8%에 抑制 現狀을 나타낸 반면에 CO<sub>2</sub> 無供給時에는 26.5% 抑制를 보여 큰 差異를 나타내었다(그림 1).

이것은 아마도 CO<sub>2</sub> 供給에 의하여 photomixotrophic cell중 光獨立營養細胞의 比率이 높아져 이들 細胞의 生長이 paraquat 處理에 의해서 크게 抑制 되었기 때문이 아닌가 思料된다.

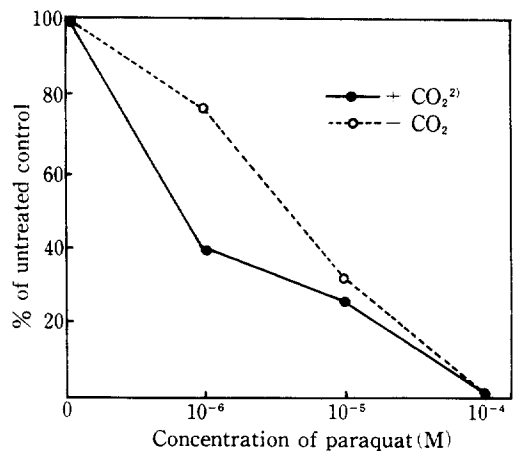


Fig. 1. Effect of various concentrations of paraquat on callus growth of *Nicotiana tabacum* under light.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Basal medium: LS liquid medium modified by sucrose 1%, NAA  $10^{-5}$  M and BA  $10^{-6}$  M. Determined at 30 days after incubation.

<sup>2)</sup> CO<sub>2</sub> was supplied by CO<sub>2</sub> buffer containing 0.4M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+1.6M KHCO<sub>3</sub>.

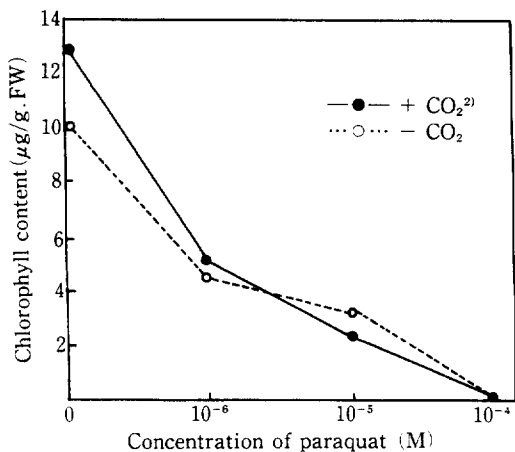


Fig. 2. Effect of various concentrations of paraquat on chlorophyll content of *N. tabacum* under light.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Basal medium: LS liquid medium modified by sucrose 1%, NAA 10<sup>-5</sup> M and BA 10<sup>-6</sup> M. Determined at 30 days after incubation.

<sup>2)</sup> CO<sub>2</sub> was supplied by CO<sub>2</sub> buffer containing 0.4 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-1.6 M KHCO<sub>3</sub>.

Paraquat 處理에 의한 綠化된 callus의 葉綠素 含量을 보면 10<sup>-5</sup>과 10<sup>-4</sup> M의 濃度에서는 CO<sub>2</sub>의 供給에 큰 影響을 받지 않았으나 10<sup>-6</sup> M 處理區에서는 CO<sub>2</sub>를 供給하였을 때 葉綠素 含量이 높게 나타났는데, 그림 1의 callus 生育量과 비교해 보면 CO<sub>2</sub> 供給에 의해서 葉綠素 含量이 높아지고 반면에 光合成 抑制型 除草劑인 paraquat 處理에 의해서 callus 生育量은 減少하는 것으로 미루어 보아(그림 2), 葉綠素 含量이 높은 細胞 즉 光獨立營養細 比率이 높은 photomixotrophic 細胞를 利用하여 光合成 抑制除草劑의 選拔에 利用可能性이 있을 것으로 思料되나 본 實驗에서는 光合成 能率을 調査한 것이 아니고 葉綠素를 測定하여 얻은 結果이고 또 paraquat가 葉綠素의 生合成을 間接적으로 抑制하는 것이 아니기 때문에 어떤 結論을 내리기는 힘들지만 間接적으로 生合成과 關係하여 類推해 볼 수 있으며 今後 酸素 電極을 이용한 光合成能率 測定 등의 實驗이 行해진 후에 確定한 結論이 얻어질 것으로 思料된다.

한편 綠化된 callus의 diuron에 대한 反應을 알아보기 위해 sucrose 1%와 sucrose 2%가 添加된 LS 固體 및 液體 培地에서 置床한 結果를

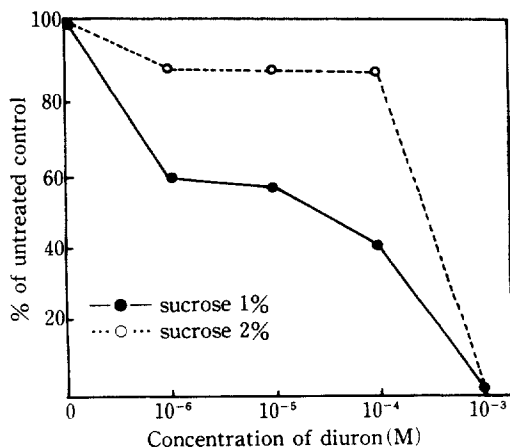


Fig. 3. Effect of various concentrations of diuron on callus growth of *N. tabacum* in sucrose 1% and sucrose 2% of medium.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Callus was cultured in LS medium modified by NAA 10<sup>-5</sup> M and BA 10<sup>-6</sup> M under light. Callus growth (% of untreated control) was determined 3 weeks after incubation.

보면, diuron 處理에 의한 callus 生長量은 濃度에 관계없이 sucrose 濃度 2%에서 보다 sucrose 1%에서 크게 抑制 되었고(그림 3), 그림 4에서 본 바와 같이 sucrose의 含量이 낮을 경우 葉綠素의 含量이 增加한 結果로 미루어 보아 diuron

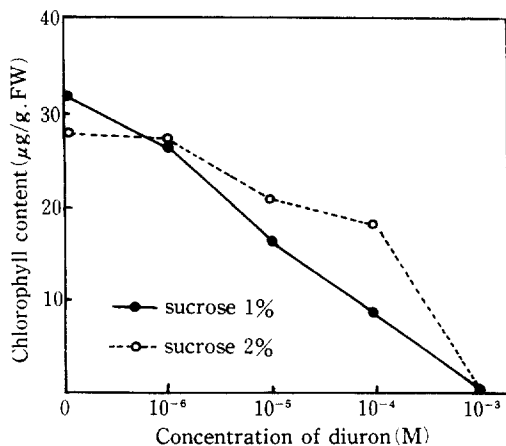


Fig. 4. Effect of various concentrations of diuron on chlorophyll content of *N. tabacum* in sucrose 1% and 2% of medium.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Callus was cultured in LS liquid medium modified by NAA 10<sup>-5</sup> M and BA 10<sup>-6</sup> M under light. Chlorophyll content (% of untreated control) was determined at 3 weeks after incubation.

처리도 葉綠素 含量이 높은 細胞의 生長을 크게 抑制한 것이 아닌가 思料된다.

Sato 등<sup>10,11)</sup>은 담배의 光獨立營養細胞 및 photoautotrophic cell에 光合成 抑制 除草劑 diuron 등을 處理한 結果 效果的인 抑制 反應을 나타냈는데, 光獨立營養細胞의 경우 抑制 效果가 가장 크게 나타나 光合成 抑制 除草劑의 選拔에 光獨立營養細胞의 使用 可能性을 報告한 바 있다. 本 實驗에서 分離한 photomixotrophic cell의 paraquat 및 diuron에 대한 抑制 反應을 나타내어 Sato 등의 實驗과 유사한 結果를 얻었으며 이것은 光獨立營養細胞 培養體系가 確立될 경우 光合成 抑制 除草劑의 選拔에 이용될 수 있다는 것을 示唆하고 있다.

## 摘 要

녹화된 callus의 제조제 paraquat와 diuron에 대한 반응을 요약하면 다음과 같다.

LS 基本 培地에 sucrose 濃度 1.0%, NAA  $10^{-5}$  M, BA  $10^{-6}$  M을 添加하여 paraquat를 處理 하였을 때 濃도가  $10^{-6}$  M에서  $10^{-4}$  M으로 增加할 수록 calli의 增殖이 抑制되고 葉綠素 含量이 減少되었다.  $10^{-4}$  M에서는 完全 枯死하였으며  $CO_2$ 가 供給되는 條件에서 抑制 정도가 높았다.

除草劑 diuron 處理 時에도  $10^{-6}$  M에서  $10^{-3}$  M으로 濃도가 增加할 수록 callus 增殖이 抑制되었으며 sucrose濃度 2.0% 때 보다 1.0%에서 훨씬 높은 抑制 傾向을 보였다.

## 引 用 文 獻

1. Arnon, D. I., 1959. Copper enzymes in isolated chloroplasts nonoxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. 24 : 1-15.
2. Ellis, B.E., 1978. Non-differential sensitivity to the herbicide metribuzin in tomato cell suspension cultures. Can. J. Plant Sci., 58 : 775-778.
3. Husemann, W. and W. Barz. 1977. Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. Physiol. Plant 40 : 77-81.

4. Kim, K.U. and S.H. Kim. 1987. Development of herbicide resistant plant through tissue culture. J. of the Kor. Soc. of Weed Sci. (2) : 200-207.
5. Kim, K.U. and Y.J. Bae. 1988. Development of herbicide tolerant tobacco through tissue culture. J. of the Kor. Soc. of Weed Sci. 8(2) : 182-186.
6. K. Nishida, F.Sato and Y.Yamada. 1980. Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and photomixotrophically cultured tobacco cells. Plant & Cell Physiol. 21(1) : 47-55.
7. Kwak, S.S., K. Ichinose, M. Kishida, S. Yoshida, N. Takahashi and F. Sato. 1989. A simple and rapid screening method for herbicidal photosynthetic electron transport inhibitor using liverwort photoautotrophic culture cell. Proc. of 12th Conf. of APWSS. pp. 581-586.
8. Oyama, K., H. Fukuzawa, T. Kohchi, M. Takeuchi, S. Chang S. Aota, H. Inokuchi and H. Ozeki. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort (*Marchantia polymorpha*) chloroplast DNA. Nature. 322 : 572-574.
9. Reeves, S.G. and D.O. Hall. 1980. Higher Plant Chloroplasts and grana. General preparation procedures (Excluding high carbon dioxide fixation ability chloroplasts). Methods Enzymol. 69 : 85-94.
10. Sato, F., S. Takeda and Y. Yamada. 1987. A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic cultured tobacco cells and seedlings. Plant Cell Reprots 6 : 401-404.
11. Sato, F., Asaka and Y. Yamada. 1979. Photoautotrophic and photosynthetic potential of chlorophyllous cells in photomixotrophic cultures. Plant Cell Physiol. 20 : 193-200.
12. 徐秀兪·金吉雄·權純泰. 1991. 光獨立營養細胞를 利用한 새로운 除草劑 選拔法 確立. I. 담배의 光獨立營養細胞 育成을 위한 培養條件의 究明. 韓國雜草學會誌 11(1).
13. Sunderland, N., 1986. Pigmented plant tissue in culture. I. Auxins and pigmentation in chloro-

phyllous tissues. *Ann. Bot.* 30 : 253-268.

14. T. Mikio, and S. Miyachi, F. Sato. 1981.  
Photosynthetic characteristics and carbonic  
anhydrase activity in cells cultured

photoautotrophically and mixotrophically and  
cells isolated from leaves. *Plant and Cell  
Physiol.* 22(1) : 51-57.