Journal of the Korean Society of
Tobacco Science. Vol. 15. No. 2(1993)
Printed in Republic of Korea.

MH 및 FA이 黃色種 잎담배의 몇가지 代謝産物변화에 미치는 영향

II. 核酸과 蛋白質含量의 變化

한상빈, 육창수*, 조성진*
한국인삼연초연구원 분석부, 충북대학교 농화학과*

Effect of MH and FA on the Change of Several Metabolites in Flue-cured Tobacco(*Nicotiana tabacum* L.)

II. Nucleic Acid and Protein Contents

Han, S. B., Yook, C. S*., and Cho, S. J*
*Div. of Chem. Anal., KGTRI, Dept. of Agri. Chem., Chungbuk National Univ.**

ABSTRACT : Using a flue-cured tobacco variety, KF 109, effect of growth regulators(fatty alcohol and C-MH) on the change of protein, DNA, and RNA were investigated.

Generally, inhibition of DNA synthesis was observed soon after become notably reduced when checked on 14 days after the treatment. Fatty alcohol treatment appeared to alleviate the inhibition of DNA synthesis caused by the C-MH treatment. It was also observed that in the tips DNA content increased slightly at the early stage after the C-MH treatment but evident reduction of it was resulted from 7th day after the treatment.

RNA content in cutters and tips was increased initially but variable transcription inhibitory activities -not so obvious as was observed in DNA synthesis- according to leaf positions were shown thereafter. Ripening of leaves probably due to senescence was advanced by the treatment of the growth regulators.

DNA content in root was relatively higher in plants treated with the growth regulators while it was clearly decreased in stalk, However, RNA contents in tissue of stalk and root was not different with that of foliage.

Increase of protein content in foliage as well as in stalk was evident 14 days after dual treatment of fatty alcohol and C-MH.

序 論

1965년 Weybrew[13]는 Meleic hydragide(MH)를 撒布한 담배곁순의 아미노산을 분석한 결과 無處理腋芽보다 그 含量이 월등히 높았으나 分布는 매우 不均衡하였다고 하여 MH에 의한 物質移動이나 蓄積등에 攪亂이 있음을 시사하였다. 담배식물을 주변환경이나 藥理物質에 매우 銳敏하게 반응하는 특성을 지니고 있어서 生長調節物質研究에 폭넓게 사용되고 있다.

그후 Wolf와 그 밖의 여러 연구자[4, 7, 8, 14]들에 의하면 摘心으로 인하여 발생하는 잎의 化學成分變化는 새로운 細胞의 생성에서 오는 것이 아니라 細胞組織의 크기변화에 기인한다고 하였으며 上位葉 일수록 생장조절물질에 대한 物質代謝作用의 변화가 큰 것으로 알려져 있다.

Systemic Chemical인 MH는 식물체내에서 단백질과 강력하게 결합함으써 酵素系에 影響을 주어 呼吸作用이나 물질이동이 抑制되며, 또한 Koiwai 및 Tso등[2, 6, 12]의 연구결과에 의하면 MH에 의하여 核酸이 선택적으로 合成이 抑制되고 일부는 養分吸收가 저지되기도 한다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 核酸化合物을 DNA와 RNA로 분리 정량하고 蛋白質 含量의 변화와 比較分析을 중심으로 最近에 國內에 보급되기 시작한 C-MH와 Fatty Alcohol(FA)에 대한 影響을 究明하고자 하였다.

材料 및 方法

栽培方法 및 植物體試料

第I報에서 報告한 바와 같이 供試品種은 황색종담배(*Nicotiana tabacum* L.) KF109로 韓國人蔘煙草研究院 일반멸칭 標準栽培法에 準하여 Pot시험으로 실시하되 토양의 通氣性과 굳어짐을 고려하여 粒子 1-2㎜의 精製모래 20%(w/w)를 혼합하였고, 底面灌水를 실시하였으며, 生體試料는 主脈을 제거하고 上, 本, 中, 下葉으로 分離하여 dry ice와 얼음이 내장된 ice box로 운반후 -70℃의 deep freezer에 貯藏하여 使用하였다.

試料採取는 摘心直後 MH처리전(1회), 처리 2시간후(2회), 1일후(3회), 3일후(4회), 7일후(5회), 14일후(6회)에 각각 실시하였다.

藥劑處理 및 實驗區의 構成

FA은 C_8(1-octanol)~C_{10}(1-decanol) group 83.3%에 界面活性劑를 보조증량시킨 접촉성 生長抑制劑로 물로서 30倍液을 만든후 발뢰기 때 1㎝ 이상의 腋芽를 모두 제거하고 20㎖/주씩 소형주사기로 腋芽 發生部位 식물체에 고루 처리하였다(6월 13일).

C-MH(유효성분 39%)는 6월 21일 오전 11시에 摘心後 처리농도에 따라 18.5배에서 74배의 물로 희석하여 각각 처리하였다.

實驗區의 構成은 무처리 手除去區를 대조구(T_0)로 하여 C-MH 적량(120㎎/주 : T_1) 처리구와 FA+C-MH적량(T_2) 처리구로 構成, 本 研究를 遂行하였다.

核酸의 定量

DNA는 Chen에 의한 修正分析法[3]으로 액체질소에 생체시료 2g을 넣고 분쇄후 urea extraction buffer로 細胞를 용해시키고 phenol과 chloroform (1 : 1) 용액을 加한 후 13,000rpm으로 원심분리하여 蛋白質과 核酸을 분리하였다. DNA가 들어있는 上層液 6㎖을 분취하고 여기에 4.4M ammonium acetate(pH 5.2) 1㎖와 4㎖의 isopropanol용액으로 DNA沈澱을 생성시킨 후 13,000rpm으로 원심분리하여 pellet을 수집하였다. 70% ethanol로 세척, 건조시킨 다음 tris-EDTA buffer용액(pH 8.0)에 녹이고 일정량을 분취하여 吸光度 260nm에서 比色定量하였다. 電氣泳動으로 純度를 확인하여 RNA가 있을 때는 RNAase를 처리하여 精製할 필요가 있다.

RNA는 생체시료 0.5g을 액체질소와 함께 분쇄후 mini-RNA extraction buffer 0.5㎖과 phenol-chloroform 혼합용액(1 : 1) 0.5㎖을 가하고 5분간 13,000rpm으로 원심분리하였다. 상기 조작을 2-3회 반복 후 上層液을 새로운 용기로 옮긴 뒤 1/10 volume의 3M NaOAc용액과 2 volume의 EtOH를 섞어 RNA 출현을 誘導하기 위하여 -20℃에서 1시간 방치하였다. 4℃에서 10분간 13,000rpm으로 원심분리한 후 pellet을 收去하여 tris-EDTA buffer(pH 8.0) 50㎕에 녹여 260nm에서 吸光度를 측정 比色定量하였다[8,4].

蛋白質 含量의 測定

蛋白質 定量은 Braford 등의 分析法[5, 11]에 준하여 生體試料 0.5g을 액체질소와 함께 분쇄 후 2.0mM의 citrate buffer(pH 5.0) 1.0㎖로 蛋白質을 추출하여 일부는 invertase activity 측정에, 일부는 蛋白質 定量에 사용하였다. 이 용액 10㎕에 0.15 M sodium chloride 90㎕와 coomassie brilliant blue G-250용액 1㎖을 가하여 실온에서 2분간 放置한 후 595nm에서 吸光度를 측정, 비색정량하였다. 標準溶液으로는 bovine serum albumin ,

(0.5㎎/㎖)을 사용했다.

結果 및 考察

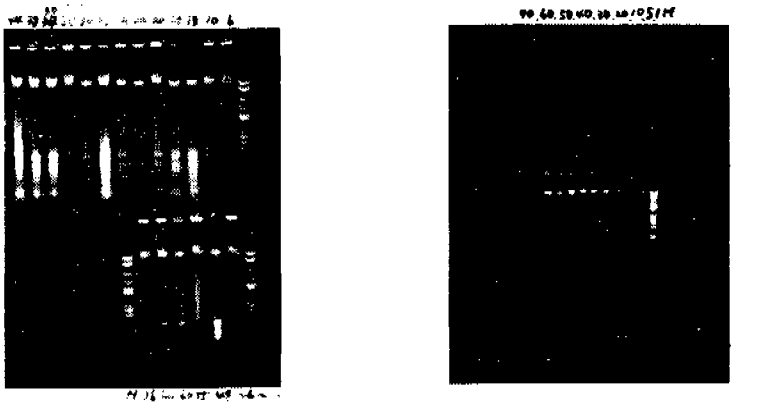
1. 核酸含量의 經時的 變化

物質代謝作用의 根幹이 되는 核酸에 대한 生長調節物質의 影響을 究明하고자 表 1에서와 같이 약제처리별 핵산 함량을 經時的으로 조사한 결과, DNA 함량에 있어서 약제처리 2시간 경과후에는 8.6㎍/g(대조구)－10.7㎍/g(MH처리구) 水準으로 약제처리전 9.2㎍/g과 대등하였으나 1일 경과 후 부터는 DNA함량의 增加幅이 처리간에 相異하게 나타나기 始作하였다. 대조구에서는 적심 후 7일까지 증가하여 17.3㎍/g을 頂點으로 다시 감소하였으나, MH 단독처리구에서는 DNA合成이 沮害되어 매우 緩慢하게 증가하였고, FA+MH처리구는 MH 단독처리구 보다 다소 높게 증가하는 傾向을 보이면서 약제처리 3일 후의 14.6㎍/g을

Table 1. Changes in nucleic acid contents of fresh tobacco leaves depending upon the post－treatment sampling time(㎍/g).

Treatment*	Item	Sampling time(days)					
		Before	2(hrs)	1	3	7	14
Control	DNA	9.2	8.6	14.3	15.8	17.3	15.2
	RNA	17.8	20.4	13.5	15.9	10.5	8.3
	Total	27.0	29.0	27.8	31.7	27.8	23.5
MH 120	DNA		10.7	12.8	11.4	11.5	8.3
(T_1)	RNA		21.5	17.3	16.4	14.2	6.8
	Total		32.2	30.1	27.8	25.7	15.1
FA 10+MH	DNA		9.7	14.3	14.6	11.9	10.2
120(T_2)	RNA		18.7	16.6	12.4	12.5	8.3
	Total		28.4	30.9	27.0	24.4	18.5

*Unit : MH : ㎎/plant, FA : ㎖/plant.



Before RNAase Treatment　　After RNAase Treatment

Fig. 1. Eletrophoretogram of deoxyribonucleic acid pellets for frest tobacco leaves.

頂點으로 다시 減少하였다. 藥劑處理 14일 경과 후에는 처리간에 顯著한 差를 보이면서 對照區(15.2㎍/g)>FA+MH處理區(10.2㎍/g)>MH處理區(8.3㎍/g)順으로 DNA합성이 抑制되었음을 確認하였다.

그림 1은 DNA pellet을 70% ethanol로 세척후 電氣泳動으로 純度를 確認한 결과, 좌측 그림에서와 같이 RNA가 확인되어 RNAase를 처리하여 純粹分離한 것이다.

앞서 檢討한 DNA함량의 全般的인 變化를 그림 2에서와 같이 葉位別로 分析한 결과, 摘心 直後에는 中葉(15.7㎍/g)>下葉(11.0㎍/g)>上葉(5.8㎍/g)>本葉(4.4㎍/g)>順으로 下位葉에 높게 分布하였으나 MH처리 후에는 매우 민감한 反應을 보이면서 上位葉의 DNA함량은 증가하는 반면, 下位葉에서는 MH처리에 의하여 減少하는 傾向을 보였다.

上葉은 MH처리에 의하여 1일(MH처리구) 또는 3일(FA+MH 처리구) 경과시까지 DNA함량의 顯著한 증가를 보인후 급격히 감소하는 경향이었으나, 대조구는 摘心後 7일을 頂點으로 서서히 증가 후 다시 감소하였고 14일 후는 대조구 16.0㎍/g에 대하여 MH처리구(14.0㎍/g)>FA+MH처리구(13.9㎍/g) 順으로 현저하게 DNA 함량이 減少하였다.

本葉에서는 대조구와 대등하게 DNA 함량이 증가하는 경향을 보였으나 MH처리구에서는 약제처리 1일 후부터 DNA합성이 억제되었음을 보여주었다.

中, 下葉에서는 葉의 伸張이 거의 中止된 狀態로 摘熟葉에 到達하면서 MH처리에 의한 처리간의 뚜렷한 傾向은 없었으나 대조구의 DNA함량이 持續的으로 증가하는 반면에 systemic agent인 MH가 식물체의 根部까지 도달하면서 下葉의 DNA함량도 현저히 감소하여 14일 경과후 대조구의 DNA함량이 13.6㎍/g인 반면에 FA+MH처리구와 MH처리구에서 8.4㎍/g와 6.1㎍/g 수준으로 이들 생장조절물질에 의한 DNA合成이 억제되었음이 확인되었다. 또한 MH처리 초기에 上位葉에서 DNA 함량이 일시적으로 증가한 결

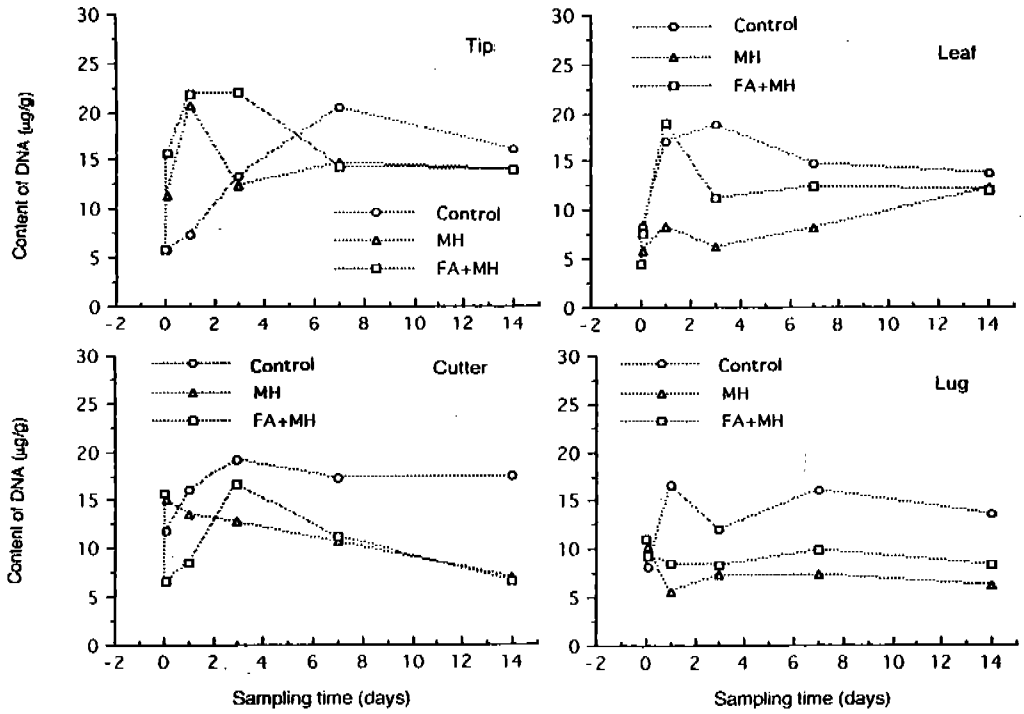


Fig. 2. Changes in DNA contents depending upon the post-treatment sampling time and leaf positions.

과에 대하여서는 보다 구체적인 연구검토가 遂行되어져야 할 것으로 생각된다.

RNA함량의 全般的인 변화를 表 1에서 보면, MH처리전 摘心直後는 17.8μg/g이었는데 2시간 경과후 MH처리구와 대조구는 일시적으로 증가하여 21.5μg/g와 20.4μg/g을 보였으나 FA+MH처리구는 18.7μg/g으로 增加幅이 다소 낮은 결과를 보였다. RNA함량은 약제처리 2시간 후를 頂點으로 全處理에서 經時的으로 감소하는 傾向을 보였으며 14일 후에는 대조구와 FA+MH처리구(8.3μg/g)>MH처리구(6.8μg/g) 順으로 MH처리에 의한 RNA 합성의 현저한 抑制作用은 볼 수 없었고 다만 MH처리에 의하여 대조구 보다 熟期가 2-3일 促進되는 것을 外觀으로 確認할 수 있었다.

또한 葉位別 RNA함량의 변화를 보면(그림 3), 上葉에서는 全般的으로 藥劑處理 2시간 후에 一般的으로 RNA 함량이 증가하였다가 漸進的으로 감소하는 傾向을 보였으며 14일 후에는 15.6μg/g(MH 처리구)~16.4μg/g(대조구)로 處理間에 對等한 結果를 보였다. 本葉에서는 上葉과 마찬가지로 對照區에서는 2시간후, MH처리구에서는 1일 經過時까지 각각 일시적인 증가현상을 보였으나 FA+MH처리구에서는 일시적인 증가현상 없이 감소하는 경향을 보여 14일 후에는 6.2μg/(MH처리구)~7.8μg/g(대조구) 水準으로 上葉보다는 顯著히 減少하였다. 中, 下葉에서는 上位葉과 같은 일시적인 RNA증가현상을 全處理에서 볼 수 없었고 경시적으로 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 잎담배가 摘心期에 到達하면 이미 下位葉은 어느 정도 適熟葉으로 成熟되어 蛋白質合成이나 糖質代謝作用등에 隨伴되는 物質移動이 둔화되어 外部反應에 민감하게 반응하지 않기 때문인 것으로 판단되었으며, 따라서 RNA의 減少傾向도 매우 緩慢하였고 약제처리 7일이 경과한 후 비로소 顯著하게 減少하였다.

그림 4는 줄기와 뿌리의 核酸 含量變化를 조사한 것으로서 뿌리의 DNA함량은 全般的으로 약제처리 후 7일까지는 증가하는 傾向을 보였으나, 14일 경과 후에는 MH처리구(7.2μg/g)>FA+MH처리구

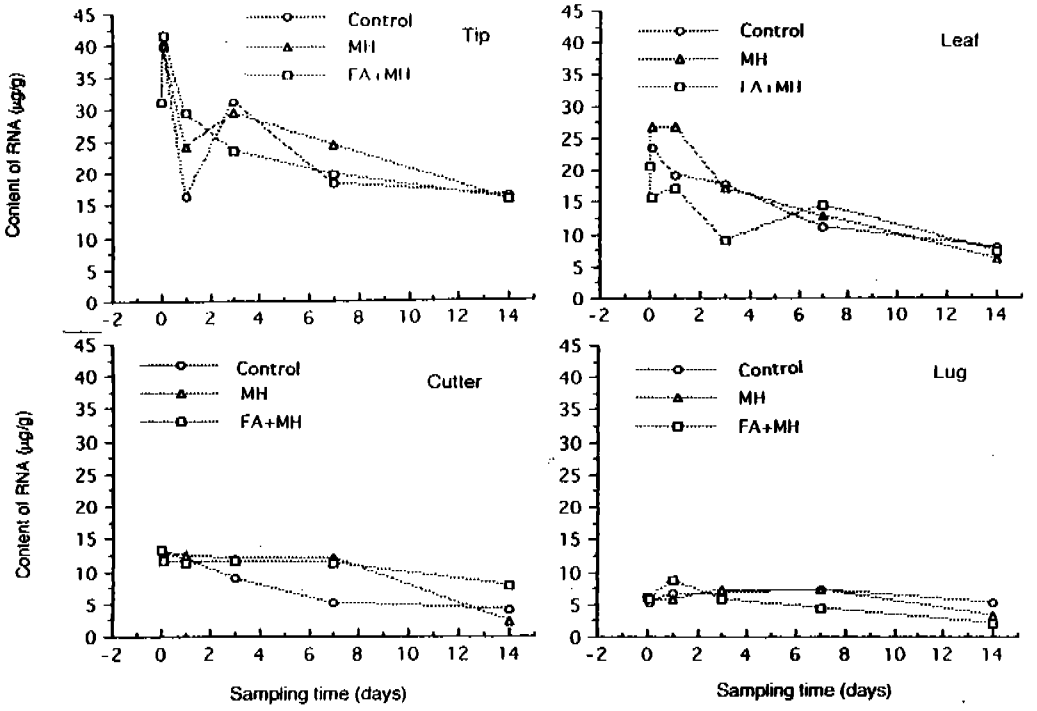


Fig. 3. Changes in RNA contents depending upon the post-treatment sampling time and leaf position.

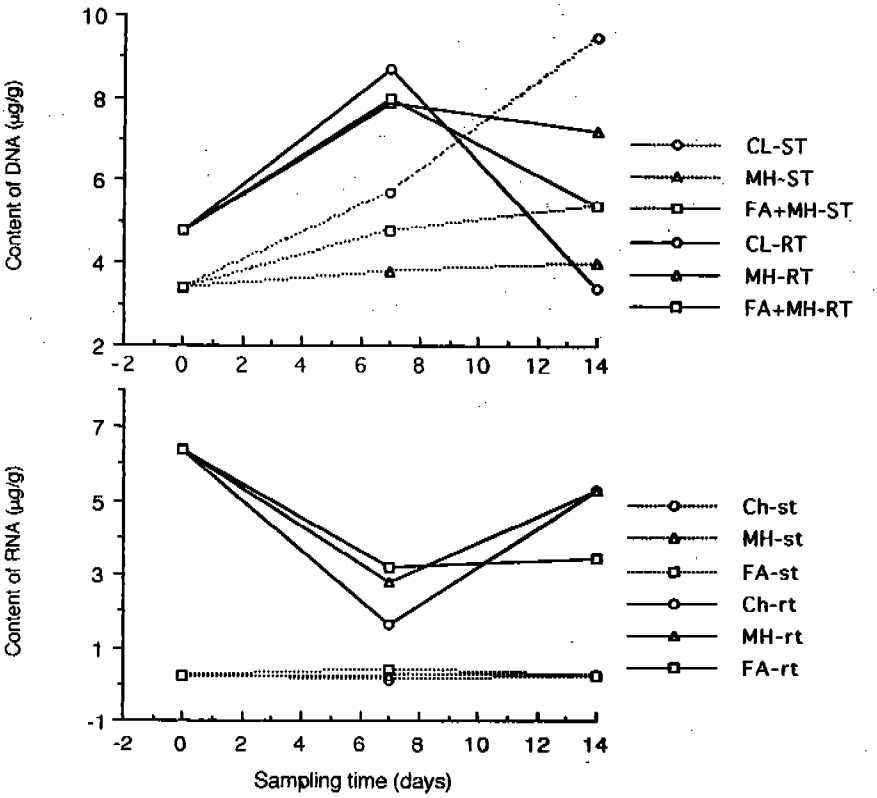


Fig. 4. Changes in the contents of nucleic acids of fresh stalk and root depending upon the post-treatment sampling time.
* ST : Stalk, RT : Root.

(5.4μg/g)〉대조구(3.4μg/g) 順으로 앞서 검토한 잎에서의 結果와는 相反되는 傾向이었다. 줄기의 DNA 함량변화는 앞서 검토한 잎의 함량변화와 동일한 傾向을 보이면서 약제처리 14일 후는 대조구(9.5μg/g)〉FA+MH처리구(5.4μg/g)〉대조구(4.6μg/g) 順으로 DNA 合成이 抑制되었음을 보여주었다.

또한 뿌리의 RNA함량은 上位葉에서의 一般的인 增加現像 같은 것은 볼 수 없었고, 全 處理에서 一時的으로 減少하다가 漸次 증가하는 傾向을 보였으나 약제처리 14일 경과 후에는 FA+MH처리구에서 1.9μg 정도 抑制되었음을 보였고 처리간에 현저한 차이는 볼 수 없었다. 줄기에서는 全處理區가 0.1-0.3μg/g 水準으로 RNA함량이 뿌리보다 顯著하게 낮은 水準을 보였고 經時的으로 일정한 傾向은 볼 수 없었다.

2. 蛋白質 含量의 變化

生長調節物質 처리에 의한 蛋白質含量의 變化를 그림 5에서와 같이 조사한 결과, 앞서 검토한 核酸含量의 변화와 유사한 傾向으로 MH처리구와 FA+MH처리구에서 약제처리 2시간후 매우 敏感한 反應을 보이면서 顯著히 증가하였는데 FA을 처리한 區에서 증가폭이 다소 높았었다. 反面에 對照區에서는 서서히 증가 후 약제처리 3일을 정점으로 다시 감소되어 약제처리 14일 경과시에는 FA+MH처리구(292μg/g)〉MH처리구(276μg/g)〉대조구(220μg/g) 順으로 FA이나 MH 같은 생장조절물질에 의하여 蛋白質 合成이 抑制되지 않는 결과였다.

또한 表 2에서 알 수 있듯이 약제처리후 經時的으로 처리간에 統計的인 有意差도 볼 수 없었

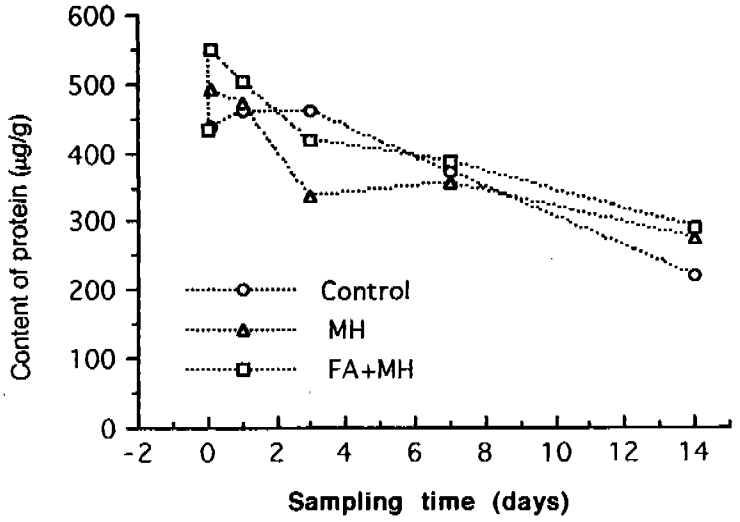


Fig. 5. Changes in protein contents depending upon the post-treatment sampling time for each treatment.

Table 2. Changes in protein contents of fresh tobacco leaves depending upon the post-treatment sampling time, KF 109.

Treatment*	Leaf position	Before	Sampling time(days) 2(hrs)	1	3	7	14
				μg/g			
Control	Tip	909	914	752	782	974	547
	Leaf	668	564	752	837	295	174
	Cutter	155	160	170	116	130	80
	Lug	98	106	175	109	79	79
	Mean	435	436	462	461	370	220
MH 120 (T_1)	Tip		968	944	726	820	650
	Leaf		763	738	405	411	180
	Cutter		173	142	118	138	170
	Lug		69	71	100	62	102
	Mean		493	474	337	358	276
FA 20+ MH 120 (T_2)	Tip		1017	925	797	856	725
	Leaf		797	848	592	385	155
	Cutter		275	137	190	158	140
	Lug		111	98	90	122	149
	Mean		350	502	417	380	292

*Unit : MH : mg/plant, FA : mℓ/plant.

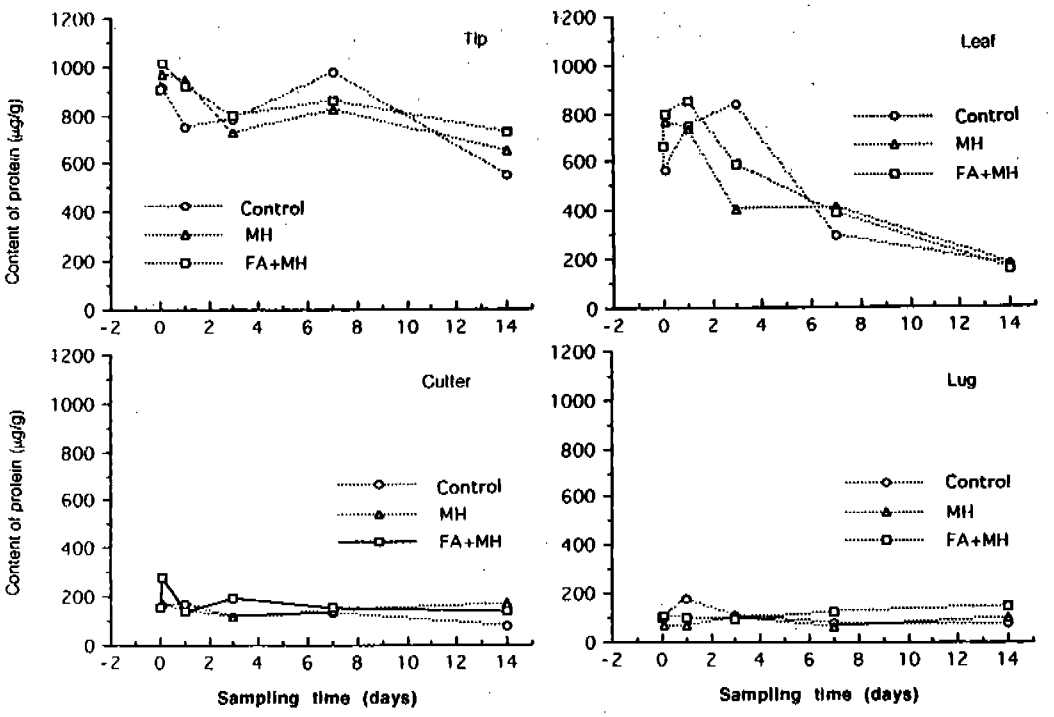


Fig. 6. Changes in protein contents depending upon the post-treatment sampling time and fresh leaf positions.

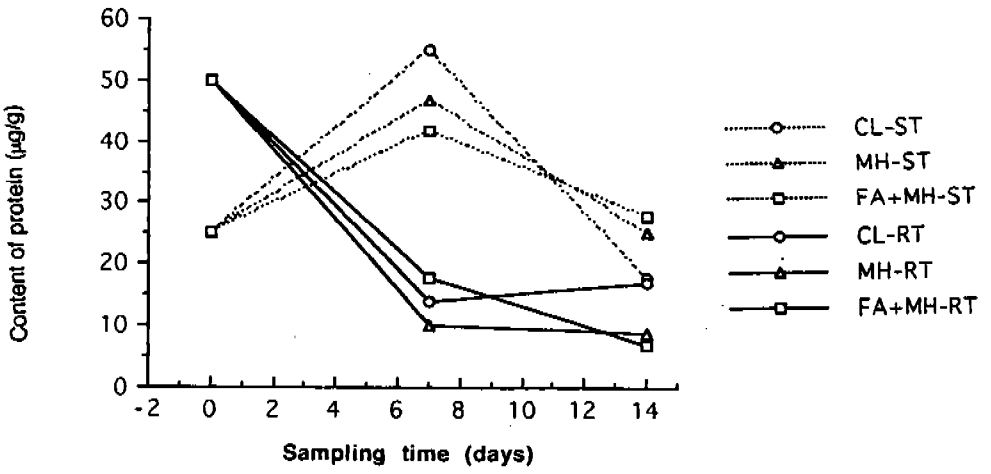


Fig. 7. Changes in protein contents of fresh stalk and root depending upon the post-treatment sampling time.

으며, 葉位別 蛋白質 함량(그림 6)은 모든 처리구에서 上>本>中>下葉 順으로 分布하였으나 일정한 傾向없이 本葉(대조구), 中葉(FA+MH처리구), 下葉(MH처리구, 대조구)에서 一時的인 增加나 減少 現像을 보인 점과, 物質移動이 가장 緩慢할 것으로 생각되는 下葉의 FA+MH처리구에서 단백질 함량이 경시적으로 增加하는 경향 등은 이들 생장조절 물질과 단백질 대사작용과의 관계를 보다 구체적으로 究明되어야 할 것으로 생각된다. 同一한 土壤條件과 일정한 기상조건에서 遂行된 Pot試驗 결과를 감안할 때 발뢰기에 fatty alcohol를 처리하므로 적심시기에 이르는 동안 미세한 단백질 蓄積이나 移動이 直間接的으로 影響을 받았을 것으로 豫想되며, 여기에 MH撒布가 隨伴되므로 alkaloid 含量은 감소하였던 결과와는 相異하게 蛋白質 함량이 증가하였던 것은 MH처리에 의한 proline, histidine등과 같은 free amino acid 合成이 促進되는 非正常的인 물질대사작용에 起因하는 것으로 생각된다[6, 10, 13].

그림 7은 藥劑處理別 줄기와 뿌리의 蛋白質含量 변화곡선으로 줄기의 단백질 함량은 一般的으로 증가한 후 약제처리 14일 經過時는 FA+MH처리구(28μg/g)>MH처리구(25μg/g)>대조구(18μg/g) 順으로 줄기에서도 생장조절제에 의한 단백질함량이 증가된 결과를 보였다. 뿌리에서는 경시적으로 모든 추리구에서 減少하는 傾向을 보이면서 줄기의 단백질 함량과는 상이하게 대조구(17μg/g)>MH처리구(9μg/g)>FA+MH처리구(7μg/g) 順으로 함유되었다.

結 論

黃色種 KF109 담배에 대한 生長調節物質(FA, C-MH) 처리가 核酸과 蛋白質含量의 變化 미치는 影響을 究明하고저 경시적으로 綜合分析하였던 바, 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

DNA는 生長調節物質 처리 초기부터 그 合成이 억제되었으며, 14일 후에는 顯著히 減少하였고, FA을 처리함으로써 DNA 合成 억제를 둔화시켰다. 上葉에서 약제처리 초기에 일시적인 DNA 증가 현상을 보였으나 7일 이후 對照區보다 顯著히 減少하였다.

RNA는 上, 中葉에서 일시적으로 增加하였으나 DNA와 같이 민감한 抑制反應은 보이지 않았으며 選擇的으로 抑制되었고, 이들 生長調節物質에 의하여 숙기가 촉진되었다.

뿌리에서의 DNA함량은 生長調節物質 처리구에서 상대적으로 높았으며, 줄기에서는 顯著히 減少하였고, 줄기와 뿌리의 RNA함량은 잎에서의 傾向과 對等하였다.

잎의 蛋白質 함량은 FA을 MH와 병행처리함으로써 약제처리 14일 후에는 顯著히 增加하였고 줄기에서도 잎과 대등한 傾向을 보였다.

參考文獻

1. Andersen, R.A., and C.C. Litton. 1975. Tob. Sci. 19 : 69~70.
2. Ashton, F.M., and A.S. Crafts. 1981. Mode of Action of Herbicides. John Wiley and Sons, NY. p. 29~39
3. Chen, J. P. Chomet, C. Mitchell, J. Wood, and S.L. Dellaporta. 1986. Plant Gene Cloning Mannual. Cold Spring Harbor. p. 2~4.
4. Koiwai, A., F. Mushiake, and K. Ozeki. 1973. Agr. Biol. Chem. 37(2) : 3813~86.
5. Masuda, H., T. Takahashi, and S. Sugawara. 1987. Agric. Biol. Chem., 51(9) : 2309~2314.
6. Naylor, A.W. 1950. Proc. Natl. Acid Sci. U.S. 36 : 230~.232.
7. Nooden, L.D. 1969. Physiologia Plantarum 22 : 260~270
8. Nooden L.D. 1970. Plant Physiology 45 : 46~52.
9. Nooden, L.D. 1972. Plant & Cell Physiology 13 : 609~621.
10. Peterson, E.L. 1952. Agron, J. 44 : 332~334.
11. Sheen, S.J., R.H. Rowe, and H.R. Burton. 1982. Beit. Tabakforschung 11(3) : 170~179.
12. Tso, T.C. 1972. Physiology and Biochemistry of Tobacco Plants. Dowden, Hutchison and Ross. p. 394.
13. Weybrew, J.A. 1965. The Free Amino Acids of Sucker Buds and Young Leaves. 19th TCTRC., Lexington, Kentucky.
14. Wolf, F.A., and P.M. Gross. 1937. Bull, Torrey Bot. Club 64 : 117~131.