

GOVP1200101818

최 종
연구보고서

632.9
L2930

유전공학기법을 이용한 병저항성 유도물질
탐색 및 식물보호제 개발

Development of Screening System and Screening
of Pathogen Defense-inducing Substances for Plants

연구기관
생명공학연구소

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "유전공학기법을 이용한 병저항성 유도물질 탐색 및 식물 보호제 개발에 관한 연구"의 최종보고서를 제출합니다.

2000 . 11. 30.

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 최 도 일

연구 원 : 윤 해 근

연구 원 : 박 경 순

연구 원 : 오 상 근

연구 원 : 이 소 영

연구 원 : 김 영 철

연구 원 : 이 현 우

연구 원 : 강 문 경

위탁연구기관명 : 서울대학교

위탁연구책임자 : 김 영 호

위탁연구기관명 : 한국화학연구소

위탁연구책임자 : 김 홍 태

요 약 문

I. 제 목

유전공학기법을 이용한 병저항성 유도물질 탐색 및 식물보호제 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 우리나라의 유전공학기법을 이용한 병저항성 유도물질을 탐색하거나 이를 기초로 식물보호제를 개발하려는 연구는 미비한 편이며, 주된 연구경향은 기존유전자를 이용한 식물의 형질전환기술에 치우쳐져 있다. 따라서, 본 연구는 야생식물(*Nicotiana glutinosa*)로부터 병 방어관련 유용유전자를 확보하여 다음의 목적에 활용 하고자 한다. 재배작물의 유전공학 및 분자육종을 통한 내병성 품종개발을 위한 유용유전자와 분자생물학기술을 이용한 병저항성 유도물질탐색 및 차세대 식물보호제 개발의 기반을 마련하고자 한다. 이러한 면에서 생명공학연구소, 농진청 산하연구기관 및 대학을 중심으로 식물의 방어관련 유전자 클로닝이 시도되고 있으나 초보적 단계이며 이분야의 더 많은 연구의 필요성을 가지게 한다. 따라서, 식물의 병저항성 반응의 생리, 생화학, 분자생물학 등 기초분야 에서의 활발한 연구가 필요하며 이를 토대로 얻어진 종합적인 지식을 새로운 병방제 수단개발에 활용하는 응용연구가 동시에 진행되어야 하고, 세계적으로 활용 가능한 data base등을 이용하여 이미 선진국에서 축적된 지식을 즉시 이용하여 이를 차원높은 응용기술 개발에 활용하려는 노력이 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 병 저항성반응의 down stream에서 발현되는 병 방어관련유전자(defense-related gene)들을 클로닝하여 유전자발현과 병원체와의 상호작용 및 병 방어관련유전자 발현에 미치는 병원체 또는 식물유래의 신호전달 물질의 역할을 연구하고 방어관련 유전자를 이용하여 식물에 과다발현 식물을 만들어 병저항성 품종육성에 이용하고 병저항성 유도물질을 탐색하여 차세대 식물보호제 개발에 이용할 수 있는 기반을 마련하고자 한다.

SUMMARY

I. Title of the study

Development of screening system and screening of plant defense-inducing substances

II. Objectives and importance of the study

Researches were performed for developing a screening system for plant pathogen defence inducing substances from natural or microorganism origin using plant defense-related genes as a tool for monitoring plant defense responses. Known natural products and culture filtrates from newly isolated microorganisms were tested for their possibility of inducing disease resistance in plants. This approach will enable us to isolate plant defence-inducing compounds from various origin.

III: Contents and scope of the study

- Isolation and test of plant defense-related genes for screening system
- Develop a technology for screening plant defense-inducing substances using Northern blot analysis
- Screening of defense-inducing substances from natural products
- Screening of defense-inducing substances from microorganisms
- Develop transgenic plants for massive screening
- Greenhouse tests
- Screening and isolation of plant virus protecting substances

IV. Results and their application

- Screening system for plant activator was developed
- Transgenic plants for massive semi in vivo screening was developed
- Natural products and microorganisms were tested for application
- Some microorganisms and compounds were selected according to their activities for inducing plant disease resistance and protecting plant virus
- Technology will be transferred to proper industry

CONTENTS
(영문목차)

Chapter 1.

Introduction

Chapter 2.

1. Introduction
2. Materials and Methods
3. Results and Discussion
4. Conclusion
5. References

Chapter 3.

1. Introduction
2. Materials and Methods
3. Results and Discussion
4. Conclusion
5. References

Chapter 4.

1. Introduction
2. Materials and Methods
3. Results and Discussion
4. Conclusion
5. References

목 차

제 1 장 서 론 -----	1
1. 병저항성 유도물질 연구 및 방어관련 유전자연구에 대한 국내외 타 연구기관 연구 내용 -----	2
1) 외국의 경우 -----	2
2) 국내의 경우 -----	5
2. 연구개발의 필요성 -----	6
제 2 장 연구 수행 내용 및 결과 -----	9
제 1 절 서 설 -----	9
제 2 절 연구 추진 방법 -----	10
1. cDNA library 및 식물재료 -----	10
2. 병 방어관련 유전자의 클로닝 -----	10
3. 선발된 유전자의 구조 및 발현연구 -----	11
4. 형질전환 식물체형성 및 생물검정 -----	11
5. 병저항성 유도물질 탐색체계 확립 및 유도물질 선발 -----	11
6. 병저항성 유도물질의 분리, 정제 및 구조결정 -----	12
7. 감염억제물질 스크리닝 및 선발 -----	12
8. 형질전환 식물체 및 병저항성 유도물질의 생물검정 -----	12
제 3 절 식물의 병 방어관련 유전자 조절물질 탐색 및 병 저항성 유도물질 탐색체계 연구를 위한 식물의 병 방어관련 유전자 확보 -----	13
1. 병 저항성 유도물질 탐색체계의 확립을 위한 식물의 병 방어 관련 유전자의 확보 -----	13
가. 연구 내용 -----	13
나. 실험재료 및 방법 -----	13

1) cDNA library 및 식물재료 -----	13
2) 병 방어관련 유전자의 클로닝 -----	14
2. 식물병저항성 기작연구 및 저항성관련 유전자 클로닝 -----	16
3. PCR 기법을 이용한 가지과 작물에서의 병저항성 유전자 클로닝 방법 -----	17
1) 실험재료 및 방법 -----	17
2) 연구 결과 -----	19
4. 병저항성 유도물질의 탐색 -----	20
1) 실험재료 및 방법 -----	20
2) 실험 결과 -----	20
5. 2차 선발균주(JM-8)인 <i>Bacillus polymixa</i> 로부터 병저항성 유도 물질의 생산조건 및 분리연구 -----	27
가. 실험 재료 및 방법 -----	27
1) JM-8 균주의 병저항성 유도물질 생산 조건 검토 -----	27
2) Plackett-Burman Method -----	27
나. 연구결과 (병저항성 유도물질의 생산 조건 검토) -----	27
6. 기지의 화학물질 탐색을 통한 병저항성 유도물질선발 -----	32
가. 실험재료 및 방법 -----	33
나. 연구결과 -----	35
 제 4 절 병 저항성 유도물질의 분리를 위한 미생물자원의 수집, 활성검정 및 분자기법을 이용한 병저항성 유도물질 탐색체계 개발 -----	37
1. 연구목적 -----	37
2. 연구내용 및 결과 -----	37
가. Endophytic bacteria의 분리 -----	37
1) 실험재료 및 방법 -----	37
2) 연구결과 -----	38
나. Endophytic bacteria 발효액의 invo screening (화학연구소에서 수행) -----	39
1) 연구내용 -----	39

2) 실험재료 및 방법 -----	39
3) 연구결과 -----	42
다. Northern blot hybridization을 통한 병저항성 유도 발현물질 탐색 -----	46
1) 연구 내용 -----	46
2) 실험재료 및 방법 -----	46
3) 연구결과 -----	47
제 5 절 병 저항성 유도 물질의 간이 대량 검정을 위한 in vitro 탐색 및 형질전환 식물을 이용한 활성물질의 탐색체계 개발 -----	49
가. 병저항성 유도물질의 간이 대량검정을 위한 in vitro 탐색체계 을 위한 형질전환벡터 제작 -----	49
1. 연구수행 내용 및 결과 -----	49
1) 연구내용 -----	49
2) 실험재료 및 방법 -----	49
3) 연구 결과 -----	50
나. 병저항성 유도물질의 간이 대량검정을 위한 in vitro 탐색체계 을 위한 형질전환 식물체 제작 -----	51
1. 연구목적 -----	51
2. 연구 내용 및 결과 -----	51
1) 실험재료 및 방법 -----	51
2) 연구 결과 -----	54
제 6 절 형질전환 식물의 활용여부 및 세포사멸 및 기주 또는 비기주 저항성 반응으로 유도되는 생체방어관련 유전자 발현여부 조사 --	62
가. PR-1a promoter :: GUS expression system을 이용한 형질전환 식물의 활용여부조사 -----	62
1. 연구 내용 및 결과 -----	62
1) 실험재료 및 방법 -----	62
2) 연구 결과 -----	65

나. 병원체의 침입시 세포사멸과 관련한 #630 promoter :: GUS fusion expression system을 이용한 형질전환 식물의 활용 -----	72
1. 연구 내용 및 결과 -----	72
1) 실험재료 및 방법 -----	72
2. 연구 결과 -----	73
참고 문헌 -----	80
제 3 장 바이러스병 저항성 유도물질 탐색 (위탁과제1) -----	91
제 1 절 서 설 -----	91
제 2 절 재료 및 방법 -----	94
1. 미생물자원, 식물자원으로부터 바이러스 감염억제물질 탐색 -	94
2. 물질의 분리, 정제 및 물질의 특성 조사 -----	94
3. 바이러스 감염 억제 mechanism 조사 -----	95
제 3 절 연구 결과 및 고찰 -----	96
1. 균류 및 야생식물 자원 수집 및 항바이러스 활성 조사 -----	96
2. 항바이러스 물질의 특성조사 -----	97
가. CKN-6 - 미동정 곰팡이 -----	98
나. SRH-12 - 담자균 -----	100
다. GTR1F-43 - 곰팡이 -----	105
라. PL-10 - 상황버섯 -----	107
마. JB-1 - 세균 -----	108
3. 바이러스 감염 억제 물질의 작용 mechanism 조사 -----	113
가. 바이러스 저항성 야생식물의 감염시 저항성 유도 물질의 추출 -----	113
나. 항바이러스제 chrysofermin D의 작용 mechanism 조사 -	114
제 5 절 결 론 -----	117
참고문헌 -----	119

제 4 장 병저항성 유도물질의 생물검정 (위탁과제2)	125
제 1 절 서 설	125
1. 병저항성 유도물질 연구	125
2. 식물체의 생체방어 및 관련유전자연구	128
제 2 절 연구 개발 수행 내용 및 결과	130
1. 병저항성 유도 물질의 스크리닝	130
가. 재료 및 방법	130
나. 결과 및 고찰	132
2. 병저항성을 유도하는 농업 소재의 탐색	142
가. 식물병에 대한 제초제의 살균활성 및 Piperophos의 벼도열병 방제 효과	142
1) 재료 및 방법	143
2) 결 과	144
3) 고 찰	145
나. 식물생장조절제의 도열병 방제효과	150
1) 재료 및 방법	150
2) 결 과	151
다. 키토산 처리에 의한 배추 무사마귀병의 방제 효과	154
1) 실험 방법	155
2) 결과 및 고찰	156
3. 무사마귀병 방제를 위한 식물내생세균의 스크리닝	159
가. 재료 및 방법	159
나. 결과 및 고찰	162
참 고 문 헌	167
본 연구와 관련하여 출판된 논문	169

제 1 장 서 론

식물의병 또는 해충에 의한 피해는 자연재해와 더불어 인류의 안정적 식량확보의 가장 큰 장애가 되어왔다. 일반적인 통계에 의하면 식물의 병 또는 해충에 의한 손실은 각각 전체생산량의 10% 정도에 이르는 것으로 나타나고 있으며 생산된 작물의 병해충에 의한 질저하까지 고려한다면 훨씬 높은 수치를 보일것이다. 또한 기상이변이나 특수한 환경 변화에 의한 일정 병해충의 대발생은 커다란 사회문제를 일으키는 경우도 있다. 일례로 1979년 및 1980년도에 우리나라에 대발병한 벼 도열병은 식량안보 차원에서 심각한 문제를 일으켰고 그 결과로 대량의 쌀을 외국에서 도입하게 되었고 한동안 사회문제가 되었었다. 한편 금년(1995년)의 중부지방의 대량 강우는 고추 및 기타작물의 병에 의한 큰 손실을 가져왔으며 고추의 경우 탄저병 및 역병의 피해로 최소한 50%이상의 수량손실이 나타난 것으로 추정되고 있다. 이와같은 병 해충방제를 위한 노력의 일환으로 인공합성된 농약을 개발 이를 방제에 이용하는 방법이 이제까지의 농업에 주로 이용되어왔다. 그러나 인구의 끊임없는 증가로 인해 더많은 양의 식량확보가 필요하게 되고 이를위한 양질의 동일품종의 대량재배(mono culture)는 병해충의 대량발생으로 이어지고 이들의 방제를 위한 합성농약의 남용으로 인해 자연생태계의 파괴는 물론 잔류독성, 인축에 대한 독성, 약제내성인 새로운 병해충의 출현 등의 문제가 최근 들어 크게 야기되고 있고 이를 대체하기 위하여 신농약(저독성농약, 천연물농약 또는 생물농약)의 개발을 위한 연구가 진행되고 있으나 그 개발속도가 수요를 충족시키지 못하고있다. 또한, 근래에 크게 일고있는 환경보호운동과 오염되지 않은 청정농산물을 취하려는 인류의 성향은 인축에 해가 없고 잔류독성이나 자연생태계 파괴의 우려가 없는 새로운 방제기술 개발체계의 확립을 절실히 요구하고 있다. 최근에 들어 유전공학기술이 발달되면서 병저항성 형질전환식물이 농약을 적게 사용하면서도 안정적인 식량작물을 생산할수 있는 대안으로 제시되고 있으며 또한, 분자생물학 과 생화학적 수준에서의 식물의 병저항성 기작을 연구하여 인축 및 환경에 독성이 없는 새로운 개념의 식물보호제를

개발하려는 시도가 선진국을 중심으로 이루어지고 있다.

따라서, 본과제 에서는 이러한 사회적 요구에 따른 청정농산물 생산을 위한 첨단농업기술개발연구의 일환으로 환경오염의 문제가 없으면서도 인류에게 안전한 식량작물을 공급하기 위하여 유전공학기법을 이용한 병저항성 품종개발 및 분자생물학기술을 응용한 새로운 개념의 저독성 식물보호제개발 등 두가지 측면에서 새로운 병방제기술 연구를 시도 하고자 한다.

1. 병저항성 유도물질 연구 및 방어관련 유전자연구에 대한 국내외 타 연구기관의 연구내용

1) 외국의 경우

가) 병저항성 유도물질 연구

병저항성 유도물질에 관한 연구는 병원체와 식물의 직접접촉 없이도 식물이 병저항성반응을 보일수 있다는 획득저항성 현상이 알려진 후 많은 관심의 대상이 되어 왔으나 아직까지도 이런 현상을 나타내는 1차적인 signal이 무엇인지는 알려져 있지 않다 (Enyedi, et.al,1992, Ryals, et. al. 1994). 최근의 연구에 의하면 식물이 합성하는 물질인 salicylic acid(Ward, et. al. 1991) 가 병원체의 개입없이도 식물이 획득저항성을 나타낼때 발현되는 pathogenesis-related proteins 유전자, chitinase 유전자, glucanase유전자, 및 peroxydase유전자등의 발현을 유도하는 것으로 알려져있고 (Chen,et. al.1993, Rasmussen, et.al. 1991, Yalpani, et.al.1991) salicylic acid 단독 처리에 의해서도 처리된 식물부위가 여러가지 병원체에 대하여 저항성을 나타낸다고 보고되었다(Gaffney,et.al. 1993, Malamy and Klessig 1992). 아미노산 유도체로 역시 식물이 합성하는 aminobutyric acid도(Chung, et. al. 1992,Crawford, et. al. 1994) salicylic acid 와 유사하게 식물의 병저항성을 유도하는 것으로 알려져 있는데 Cohen등은(1994) aminobutyric acid가 처리된 토마토는 그렇지 않은 토마토에 비해서 역병의 피해를 현격히 적게 받음을 관찰하였고 이물질의 처리에 의해서 앞에서 언급된 pathogenesis related protein이 다량 축

적됨을 보고 하였다. Ghaouth등은(1994) chitosan이 관개수를 통하여 오이 식물체에 공급되었을때 *Pythium* 에 의한 뿌리썩음병이 현저히 줄어들고 또한 세포학적 측면에서 식물의 방어기작이 유도됨을 보고하였다. 지방산 및 지방산유래 물질이 식물의 방어기작을 유도하는것이 보고 되었는데 감자 역병균과 감자의 상호작용 에서는 역병균의 상호작용에서는 역병균 (*Phytophthora infestans*)의 세포막에 다량 존재하는 arachidonic acid 또는 eicosapentaenoic acid가 역병균의 개입없이 항균물질인 phytoalexin 축적을 유도하고 (Bostock, et. al. 1981), phytoalexin 합성에 관여하는 효소인 HMG-CoA reductase 유전자를 조절하여(Choi, et. al. 1992)대사적인 측면과 생리적 측면에서 병저항성 반응과 동일한 반응을 보임이 보고되어 있다. Jasmonic acid 또는 methyl-jasmonate는 식물의 지방산인 linolenic acid 에서 유래된 물질로 Cohen등(1993)에 의해 감자 및 토마토를 역병으로부터 보호해줄 수 있는 것이 증명되었다. 병저항성을 유도할수 있는 물질로 알려진 또다른 예는 soluble silicon으로 Cherif등 (1994)에 의하면 이의 처리에의해 오이과 식물에서 chitinase, peroxidase, 와 polyphenoloxidase발현이 유도 되었고 또한 silicon 처리된 식물의 추출물이 *Pythium* 의 생육을 억제하는 것이 보고되었다. 미생물에 의해서 식물의 획득저항성이 유도되는 경우도 보고되어 있는데 Maurhofer등(1994)에 의하면 담배의 뿌리에 정착하는 길항세균인 *Pseudomonas fluorescens* 에 의해 담배식물체가 Tobacco Necrosis Virus에 대해 저항성이 유도된다고 알려졌다. 미생물 또는 다른 병원체에 의한 유도저항성은 cross protection 이라는 개념으로 이해되고 있으며 TMV와 담배, *Fusarium lateritium* 과 고구마(Clark 1994)외에도 여러가지 식물에서 알려져 있다. 천연불에 의한 식물의 병저항성유도기작을 이용하여 스위스의 다국적 농약 회사인 Ciba-Geigy는 Salicylic acid유도체를 이용하여 Plant Activator라는 저독성 농약개발에 성공하여 근시일내에 시판예정이며 유수의 농약회사들도 이러한 제품개발에 박차를 가하고 있다.

나)방어관련 유전자연구(Defense-related genes)

식물은 여러가지 다양한 방법으로 외부로부터 침입해 들어오는 병원균을 방어하는 데 그것은 첫째, 구조적인 벽을 만듦으로서 병원균의 침입 또는 확산을 막는 방법으로 세포벽에 lignin과 같은 물질을 축적하여 침입을 방해하는 방법, 침입된 세포자체를 죽여 버림으로서(과민성 반응) 절대 기생체인 병원체의 확산을 막은 방법 등이 바로 이것이다. 둘째는 생화학적인 방어방법인데 병원체의 생육을 억제하는 화학물질을 생합성 축적하여 병원균의 확산을 막는 방법으로 감염된 부위에 축적되는 phytoalexin 등이 이 방법에 속한다. 생화학적 방어기작은 오래전부터 식물의 병저항성 기작의 하나로 많이 연구 되었는데 특히 콩과식물(Leguminosae)의 isoflavonoid phytoalexin 합성과 관련하여 이의 합성에 관여하는 유전자인 phenylalanine ammonia lyase(PAL, Hoebereider et. al. 1989, Bolwell, et. al. 1985, cramer, et. al. 1989) 및 chalcone synthase(CHS, Chappell and Hahlbrock, 1984, Harker, et. al. 1990, Ryder, et. al. 1984, Ryder, et. al. 1987)가 오래전에 cloning 되었고 병저항성 및 phytoalexin 합성과 관련한 그 생합성 경로가 많이 연구되어 있다(for review Regrand, 1983, Hahlbrock and Scheel, 1989). 가지과 식물(Solanaceae)에서는 전혀 다른 경로인 isoprenoid 생합성을 통하여 phytoalexin이 합성되는데 이의 합성관련 효소인 HMG Co-A reductase(HMGR, Choi, et. al. 1992, Choi, et. al. 1994, Choi and Bostock 1994) 유전자가 본 연구자에 의해 cloning 되었고 sesquiterpene cyclase(SC)와 병저항성과의 관련관계가 연구되었다. 식물이 어떤 병원체에 의해 일부 괴사(necrosis)가 일어났을때 병원체에 감염되지 않은 다른 부위가 여러가지 병원체에 대해 상대적으로 저항성을 띠는 현상을 보여주는데 이를 획득저항성(Systemic Acquired Resistance)이라고 한다. 획득저항성(SAR)에 대한 기작은 오랫동안 많은 연구자들에게 흥미의 대상이 되어 왔으며 최근 이 저항성의 발현이 자연계에 존재하는 물질인 salicylic Acid 및 pathogenesis related protein(PR-protein) 축적과 관련되어 있음이 밝혀졌다(Ward, et. al. 1991, Yalpani, et. al. 1991,

Rasmussen, et. al. 1991, Enyedi, et. al. 1992, Chen, et. al. 1993), 획득저항성의 발현과 더불어 다량축적되는 PR-protein들에 관한 연구가 활발히 진행되어 그중 일부가 glucanase(Edelbaum, et. al. 1991) 및 chitinase임이 밝혀졌다 (Beerhues and Kombrink, 1994). 여러가지 아직 기능이 확인되지 않은 PR-protein들(Brederode, et. al. 1991, Rhoads and McZn tosh, 1993, Casa cuberta, et. al. 1991, Fleming, et. al. 1991, Pfitzner, et. al. 1991, Simmons, et. al. 1992, Friedrish, et. al. 1991, Pfitzner and Goodman 1987)도 cloning 되어있다. 획득저항성 연구의 특이할 만한 사항은 식물이 병저항성을 나타낼때 발현되는 유전자들 (PR-protein genes) 의 존재이며 이들 유전자가 병원체의 직접개입 없이도 화학물질 (salicylic acid 또는 aminobutyric acid)에 의해서도 그 발현이 유도되고 식물을 여러가지 병해로부터 보호할수 있다는 사실이다. 병저항성 유도물질은 자연계에 존재하며 독성이 매우낮고(salicylic acid 는 아스피린 유도체로 인체의 해열제로 쓰이고 있으며 aminobutyric acid 는 아미노산 유도체로 식물이 합성하는 것으로 알려져 있다) 만약 효율적인 선발법이 개발된다면 새로운 개념의 차세대 식물 보호제 로서의 개발 가능성을 가지고 있다.

2) 국내의 경우

가)방어관련 유전자 연구

최근에 들어 식물분자생물학 연구가 활성화 되면서 대학, 농진청산하 연구기관, 출연 연구기관, 및 일부 사기업연구소에서 식물의 방어기작이 연구의 대상이 되고 있다. 농촌진흥청 산하연구기관 에서는 주로 작물을 대상으로 식물의 방어에 관련된 2차대사 관련 유전자(벼의 HMG CoA reductase gene, 와 토마토의 Phenylalanine Ammonia Lyase gene) 및 병발생관련 단백질 유전자 (Pathogenesis-related protein genes)등을 클로닝하고 작물의 분자육종에 이용하는 연구를 시행하고 있다. 미생물 또는 동물유래의 유용유전자를 식물에 형질전환 하여 병저항성 식물을 만드는 시도도 행해지고 있다. 생명공학 연구소와 한국인삼연초 연구원의 공동연구로 바이러스 유전

자를 이용한 바이러스내성 연초품종육성이 보고된바 있다. 대학의 연구도 활성화 되어 경상대학교 식물유전자조작센터, 서울대학교등에서 기초연구를 목표로한 유용유전자 클로닝이 활발히 진행되고 있다. 전반적인 고급연구인력의 부족과 연구비의 부족등으로 아직까는 연구가 종합적으로 진행되지 못하고 있으며 연구개발을 통하여 산업화 단계에까지 도달 되지 못하고 있는 실정이다. 유용유전자의 Pool과 이를 이용한 식물의 병 해충에 대한 방어기작연구가 국가 및 산업 재산이 되려면 더 많은 연구집단과 더 많은 연구비투자가 필요하며 다양한 유전자원의 확보가 곧 농업 및 농약산업의 국제경쟁력을 확보하는 관건이 될것으로 여겨진다.

나)병저항성 유도물질 및 신개념의 식물보호제연구

병저항성 유도물질 및 감염억제물질의 개념은 최근들어 식물의 병저항성기작이 분자 생물학 수준에서의 이해가 확대되면서 도입된 개념으로 아직까지 국내에서는 초기연구 단계이다.

2. 연구개발의 필요성

분자 생물학 기법을 이용한 식물의 병저항성기작 연구를 통하여 인류와 인류가 생존하고있는 생태계의 안전을 보장할 수 있는 새로운 병방제 수단 개발이 필요하다. 선진 각국을 중심으로한 이 분야의 연구는 상당한 진전이 있어 최근 식물의 병원체에 대한 방어기작을 상당부분 이해하게 되었습. 최근의 연구결과를 통하여 상당수의 병저항성관련 유전자들이 클로닝 되었고 이 유전자 들의 발현 및 조절 연구를 통하여 새로운 식물보호제개발을 위한 타겟을 찾고 있다. 식물의 병 해충 침입에대한 방어기작이 매우 활발히 연구되고 있으며 여기서 얻어진 연구결과들을 실용화 하려는 시도가 선진각국에서 이루어 지고 있습. 국내의 경우 이분야의 연구인력이 충분히 확보되어 있습에도 불구하고 여러가지 사정에 의하여 연구가 미진한 편이며 선진국과의 기술 경쟁력 확보를 위해서도 연구비와 연구인력의 투자가 필요한 실정임. 본 과제는 이러한 기술적 진전과 연구인력을 토대로하여 식물로부터 본연구팀에의해 이미 확보된 식물의 병원체에대한 방어관련 유전자를 이용하여 인축 및 환경오염피해 없이 식물의 고유한 병방어 기작을 유도하는 새로운 개념의 식물보호제를 개발 하고자 한다. 최근의 분자생물학 분야의 급격한 발달로 식물학 및 농학분야에서 생명현

상의 이해가 가속화 되고 있다. 농업분야에서의 생명과학 연구는 여러가지 유용유전자 확보로 이어지고 이들 유전자의 직·간접적인 이용을 지적재산권화 하고 있는 추세이다. 생물학 분야의 지적 재산권 확보 여부는 2000년대의 주력산업으로 여겨지는 생명공학제품시장의 국제경쟁력을 결정짓는 주요 요인으로 여겨진다. 농업분야에서는 종자, 종자처리기술, 및 작물보호분야의 신기술 또는 신상품이 2000년대 농업관련 제품의 주종을 이룰 것으로 예측된다. 우리나라의 현재 농약원제를 거의 전량 수입에 의존하고 있으며 1994년 현재 그 시장 규모가 \$ 7.2억 에 달하고 있음(Agrow, 250, p19 1996년). 현재 선진국을 중심으로 저독성 농약개발이 시도되어 인축에 독성이 없고 단지 식물의 방어기작을 유도하여 식물을 보호하는 새로운 기작을 갖는 식물보호제 개발이 시작 되었으며 이것이 성공되면 약 28조원으로 추정되는 2000년대 농약시장의 상당부분을 차지 할 것으로 여겨진다. 유전공학 기법을 이용한 병저항성 기작연구는 선진국의 경우 이미 상당한 수준에 이르러 그 지식을 새로운 개념의 식물보호제 개발에 이용하여 근시일내에 제품 (Biochemical Pesticide)이 시장에 선 보일것으로 예측됨 (Agrow, 236, p15, 1995년). 국내의 경우 이 분야의 연구인력이 확보되어 있고 상당 부분의 기초연구가 진행되어 있기 때문에 연구비의 효율적인 투자로 선진국과의 기술경쟁력확보가 가능 할 것으로 여겨진다. UR등 시장 개방 압력이 거세지면서 우리나라의 농업은 이제까지의 노동력집약 산업에서 고부가가치 창출이 가능한 종자 및 농약산업등으로 전환이 필요한 시점이다.

환경오염과 농약에 오염되지 않은 청정농산물에 대한 관심이 고조되어 농약사용을 경감 시키면서 안정적 생산이 가능한 유전공학 식물제품(종자) 개발은 더욱 가속화될 전망이다. 농약개발 측면에서는 기존약제의 인축에 대한 독성과 잔류독성에 의한 생태계파괴가 문제시 되고 있으며 이를 극복 할 수 있는 새로운 개념의 저독성 농약개발이 요구되고 있다. 최근의 식물 병리학 및 식물분자생물학의 발달은 식물의 병저항성기작 이해에 기여하여 새로운 개념의 저독성 식물보호제 개발을 가능하게 하고 있다. 실례로 스위스의 다국적 농약회사인 Ciba-Geigy사는 식물의 분자수준의 병저항성 기작을 이용하여 병원체가 직접타겟이 아닌, 식물의 병저항성을 유도하는 가칭 'Plant Activator'라는 제품을 개발하여 상업화할 예정이라 한다

(Agrow, 236, p15). 사회적 요구와 이슈에 의해 이러한 새로운 개념의 “농약?” 개발은 더욱더 가속화 될 전망이다. 우리나라의 경우 농약의 전량을 외국에서 도입(또는 기술도입)하여 의존하고 있으며 만약 앞에서 언급된 생명공학 기술이 응용된 제품들이 상업화 되었을때 이에 대비한 국제경쟁력을 전혀 가지고 있지 못한 실정이다.

유전공학기법을 이용한 식물의 병방제수단 개발분야는 크게 두가지 분야에서의 연구가 주목되고 있다. 첫째는, 무궁무진한 제배종 및 야생종식물체에 이미 존재하고 있는 방어관련 유전자의 클로닝 및 식물의 병방어 기작연구를 통한 유용유전자 확보, 분자유종의 시도, 야생식물이 가지고 있는 형질인 비기주저항성기작의 연구 및 이를 기주식물저항성에 응용하는 연구이다. 재배되고있는 식물의 저항성 유전자클로닝은 이미 벼, 토마토, 담배, Arabidopsis 등의 식물에 성공했거나 연구에 많은 진전을 보이고 있으나 비기주 저항성은 그 특성상(교배를 통한 확인이 불가능) 연구가 매우 미진한 상태에 있다. 분자생물학의 연구기법과 유전공학기술의 발달로 짧은 시간내에 수많은 유용유전자 확보가 가능해 졌으며, 출원되는 특허의 건수도 급증하고 있는 실정이다. 앞으로 이와같이 지적재산권화 되어 있는 수 많은 유용유전자를 이용한 생명공학 식물제품이 다수 시장에 등장하여 2000년대의 종자 및 농산물시장의 주류를 이룰것으로 전망된다.

둘째는, 분자생물학의 발달로 식물의 병 해충 및 기타 스트레스에 대한 방어기작이 밝혀 질 것으로 전망되며 이 지식을 이용하여 인위적으로 식물의 방어기작을 조절할 수 있는 물질(식물조절제, Plant Activator)개발이 활성화 될것으로 전망된다. 실제로 식물의 병저항성 기작을 유도할 수 있는 물질이 산업화 직전 단계에 와 있으며(Ciba-Geigy Co. Agrow Vol 236 참조) 앞으로 이 분야의 제품개발이 가속화 될것으로 전망된다. 참고적으로 미국의 경우만 농약시장이 연간 약 250억불로 내병성작물 및 저독성농약개발로 환경적으로 건강한 농업을 추구하여 전통적 농약의존 농업에서 새로운 지속적 경작가능농업(Sustainable Agriculture)으로 전환을 시도하고 있으며 이러한 대체기술이 개발되면 전체시장의 상당부분을 쉽게 점유하게 될것으로 전망된다.

제 2 장 연구 수행 내용 및 결과

제 1 절 서 설

식물체의 병저항성 반응에는 병저항성 유전자와 병방어관련 유전자가 관여하는데, 병저항성 유전자는 병원체의 비병원성 인자와 작용하여 저항성 또는 감수성인 반응의 특이성이 결정을 지으며, 다양한 병원균 (또는 병원체)의 race에 대하여 매우 특이적이며 다양한 유전적 배경을 가지고 있다. 따라서 병방어관련 유전자 (대사에 관련 방어유전자 및 생화학적 방어 관련유전자들)는 특이적 저항성 유전자의 조절을 받으면서도 다양한 종 및 다양한 병의 현상에서 공통성 혹은 유사성을 가지고 있다. 예를들면, 담배의 모자이크 바이러스 (Tobacco Mosaic Virus; TMV)에 대한 저항성은 N 유전자라는 저항성 유전자가 존재할 때 만 가능하고, 역병 (*Phytophthora* sp.)에 대한 저항성은 역병저항성 유전자가 존재할 때 만 가능하다. 그러나 이들 두개의 상이한 병원체에 대한 저항성반응을 보일 때에도 발현되는 유전자들은 동일 유전자 (또는 기능이 유사한 유전자)들이 발현되며 또한 다른종의 식물에서도 병저항성 반응을 보일 때에도 이와 유사한 유전자들의 발현양상을 관찰할 수 있다. 이들 유전자들의 발현을 조절하는 물질 또한 공통성 및 다양성을 가지고 있다고 보고 되었다.

따라서, 본 연구에서도 이미 당 연구팀에 의해서 이미 확보되어 있는 병저항성반응시 down stream에서 발현 유도되는 병 방어관련 유전자 (defense-related gene)들을 이용하여 유전자 발현과 병원체와의 상호작용 및 방어관련 유전자 발현에 미치는 미생물 또는 식물유래의 신호전달 물질을 분리하고 방어관련 유전자를 이용하여 병저항성 유도물질을 탐색하여 차세대 식물보호제 개발에 이용할 수 있도록 기반을 마련하는 것이 목적이다. 이에 대한 전략으로 다음과 같은 방법을 이용하고자 한다.

제 2 절 연구 추진 방법

1. cDNA library 및 식물재료: 야생식물인 *N. glutinosa* 의 병저항성이 유도된 cDNA library는 이미 제작되어 있으며 이 library를 이용하여 식물이 병저항성 반응을 보일때 특이적으로 발현이 증가되는 PR-protein(pathogenesis-related protein)의 일종인 PR-1유전자 및 Glucanase 유전자가 성공적으로 클로닝 되었다. 야생식물의 병방어관련 유전자는 이 유전자은행을 통하여 여러가지 접근방법으로 클로닝 하며, 형질 전환을 위한 식물재료로는 고추 및 담배를 일차적인 모델체계로 하여 가능성 있는 유전자들이 확보 되는 대로 타 작물에 확대적용 할 예정이다. 한편, 병저항성 유도물질 스크리닝은 가지과 식물인 담배와 고추를 이용하며 바이러스 및 기타 병원체에대한 감염 억제물질 스크리닝은 담배 모자이크 바이러스와 담배 및 토마토를 모델로하여 스크리닝함.

2. 병 방어관련 유전자의 클로닝: 병원체에 대한 방어에 관련된 유전자를 클로닝 하기 위하여 differential screening 과 subtraction hybridization 을 행함. differential screening을 위하여 전신저항성이 유도된 야생식물체에서 분리한 mRNA와 정상적인 야생식물체에서 분리한 mRNA를 probe로 사용하여 이미 제작되어있는 cDNA library를 차별스크리닝 하여 병저항성 반응을 보일때만 특이적으로 발현되는 유전자를 선별한다. 1차 선별된 클론 들은 순수분리 과정을 거쳐 RNA blot hybridization을 통하여 특이적 발현여부를 확인하고 병저항성 반응시 특이적으로 발현되는 유전자는 Sanger의 didioxy sequencing방법에 따라 염기서열을 결정한다. Differential screening이 가지고 있는 문제점을 보완하여 저항성반응 특이적 유전자를 농축시키기 위하여 subtractive hybridization(Cook, et. al., 1995, Wang, et. al. 1991, Milner, et.al. 1995, Schweinfest, et. al. 1990, Sive and Jhon, 1988)을 행한다. 이미 제작된 induced-cDNA library 를 무작위로 in vivo excision하여 ssDNA(negative strand)를 얻고 이를 과량의 (10x, positive strand mRNA) biotin과 결합된 un-induced mRNA와 hybridization하여 Avidin과 반응시켜 폐놀을 이용하여 RNA/DNA hybrid를 제거한다. 병 방어관련 유전자가 농축된 분획은 PCR을 이용하여

증폭시키고 같은 과정을 2회 계속하여 정상적인 식물과 저항성반응을 보이는 식물에 공통적으로 존재하는 유전자를 제거하고 병 방어관련 유전자를 농축하여 plasmid vector에 클론하여 무작위로 일부의 염기서열을 결정하고 데이터 베이스에 조회하여 신규 유전자 여부를 검증함.

3. 선발된 유전자의 구조 및 발현연구; 위의 과정을 통하여 다수의 병 방어관련 유전자를 확보하여 일부분의 염기서열을 결정하고 data base에 조회하여 신규유전자 여부를 확인하고 신규성이 확인된 유전자는 전체 염기서열을 결정하고 유전자 특이적 프로브를 제작하여 genomic DNA southern blot을 통하여 유전자의 게놈상에서 수와 구조를 연구하고 식물 병원체 또는 기타의 환경자극에 의한 유전자 발현여부를 RNA blot을 통하여 확인하고자 한다. 또한, 신규성이 확인된 유전자는 국내 및 국제특허에 출원하고 그 유전자를 이용한 경제작물의 형질전환체육성에 이용한다.

4. 형질전환 식물체형성 및 생물검정; 이 연구에서 얻어지는 병저항성 특이적 발현유전자는 현재 성공적인 식물형질전환 체계를 가지고 있는 고추 및 담배를 모델로 일차적인 형질전환체를 얻고자한다. 형질전환식물은 고추의 경우 고추 역병균(*Phytophthora capsici*) 및 고추탄저병균(*Colletotricum spp.*), 담배의 경우 담배 모자이크 바이러스(TMV)를 이용하여 새로운 유전자의 삽입 또는 과다발현에 의한 양적 병저항성의 증가를 검정한다. 형질전환을 위한 *Agrobacterium*균주 및 T-DNA construct은 바로 기타의 경제성 작물에 새로운 형질전환 식물체를 얻는데 이용될 수 있다.

5. 병저항성 유도물질 탐색체계 확립 및 유도물질 선발; 위의 연구를 통해 확보된 방어관련 유전자를 이용하여 다양한 시료의 방어관련 유전자 유도발현 여부를 시료를 처리한후 처리된 식물조직에서 전체 RNA를 분리하여 Northern Blot Hybridization을 통하여 병저항성 유도물질 존재여부를 확인하고 불질을 추적 순수분리한후 실제 식물체상에서 병저항성 유도여부를 생물검정으로 확인함. 한편, 이미 병저항성 유도역할을 하는 물질로 알려진 salicylic acid, aspirin, 및 aminobutyric acid 등을 선발 marker로 이용하며 이들 물질의 유도체 또는 새로운 천연물, 미생물 등을

screening하여 새로운 병저항성 유도물질을 선발한다.

6. 병저항성 유도물질의 분리, 정제 및 구조결정: 선발된 화학물질이 나 미생물의 작용기작을 분리된 유전자의 발현 및 식물의 2차대사산물을 이용하여 연구하고 화학물질일 경우 일반적인 분리정제의 방법에 따라 물질을 분리, 정제하고 그 구조를 결정하여 새로운 물질후보를 다시 screening 하는 정보로 이용하고 미생물일 경우 그 미생물을 분류, 동정하여 새로운 미생물을 선발하는 정보로 이용함.

7. 감염억제물질 스크리닝 및 선발:

위탁연구과제 참조

8. 형질전환 식물체 및 병저항성 유도물질의 생물검정:

위탁연구과제 참조

제 3 절 식물의 병 방어관련 유전자 조절물질 탐색 및 병저항성 유도물질 탐색체계 연구를 위한 식물의 병 방어관련 유전자 확보

1. 병 저항성 유도물질 탐색체계의 확립을 위한 식물의 병 방어관련 유전자의 확보

가. 연구 내용

본 연구에서는 저항성 유전자를 가지고 있는 담배 식물체가 병원체에 대해 나타나는 병저항성 발현의 형태와 병저항성 유도물질 및 감염억제물질의 탐색체계를 확립하기 위하여 병저항성 관련 유전자를 확보하였다. 더 불어 담배 및 가지과 식물의 유전자도 확보하므로써 종간의 병저항성 발현형태를 비교해 볼 수 있다. 이미 보유하고 있는 PR-1, β -1,3-glucanase, metallothionein-like gene, proteinase inhibitor, 감자의 HMG-CoA reductase 이외에 담배의 chitinase, phenylalanine ammonia lyase, peroxidase 와 고추와 토마토의 chitinase, phenylalanine ammonia lyase를 PCR 기법을 이용하여 클로닝 하였다. 또한 병저항성 유도물질을 찾기위해 이미 이러한 역할을 할 것으로 알려진 화합물들인 probenazole, β -aminobutyric acid, KC, copper등을 저항성 유전자를 지니고 있는 담배에 처리한 후 식물체에서 전체 RNA를 분리하여 병 저항성유전자인 PR-1, β -1,3-glucanase의 농도별 시간별 유전자 발현을 조사하므로써 병저항성 유도물질 탐색을 위한 체계 확립을 하고자 하였다

나. 실험재료 및 방법

1) cDNA library 및 식물재료: 야생식물인 *N. glutinosa* 의 병저항성이 유도된 cDNA library는 이미 제작되어 있으며 이 library를 이용하여 식물이 병저항성 반응을 보일때 특이적으로 발현이 증가되는 PR-protein(pathogenesis-related protein)의 일종인 PR-1유전자 및

Glucanase 유전자가 성공적으로 클로닝 되었다(Yun *et al.*, 1999, *J. Plant Physiol.* 논문출판). 야생식물의 병방어관련 유전자는 이 유전자은행을 통하여 여러가지 접근방법으로 클로닝 하며, 형질전환을 위한 식물재료로는 고추 및 담배를 일차적인 모델체계로 하여 가능성 있는 유전자들이 확보되는 대로 타 작물에 확대적용 할 예정이다. 한편, 병저항성 유도물질 스크리닝은 가지과 식물인 담배와 고추를 이용하며 바이러스 및 기타 병원체에 대한 감염 억제물질 스크리닝은 담배 모자이크 바이러스와 담배 및 토마토를 모델로하여 스크리닝함.

2) 병 방어관련 유전자의 클로닝; 병원체에 대한 방어에 관련된 유전자를 클로닝 하기 위하여 differential screening 과 subtraction hybridization 을 행함. differential screening을 위하여 전신저항성이 유도된 야생식물체에서 분리한 mRNA와 정상적인 야생식물체에서 분리한 mRNA를 probe로 사용하여 이미 제작되어있는 cDNA library를 차별스크리닝하여 병저항성 반응을 보일때만 특이적으로 발현되는 유전자를 선발한다. 1차 선발된 클론 들은 순수분리 과정을 거쳐 RNA blot hybridization을 통하여 특이적 발현여부를 확인하고 병저항성 반응시 특이적으로 발현되는 유전자는 Sanger의 didoxy sequencing방법에 따라 염기서열을 결정한다. Differential screening이 가지고 있는 문제점을 보완하여 저항성반응 특이적 유전자를 농축시키기 위하여 subtractive hybridization(Cook, *et. al.*, 1995, Wang, *et. al.* 1991, Milner, *et.al.* 1995, Schweinfest, *et. al.* 1990, Sive and Jhon, 1988)을 행한다. 이미 제작된 induced-cDNA library 를 무작위로 *in vivo excision*하여 ssDNA(negative strand)를 얻고 이를 과량의 (10x, positive strand mRNA) biotin과 결합된 un-induced mRNA와 hybridization하여 Avidin과 반응시켜 페놀을 이용하여 RNA/DNA hybrid를 제거한다. 병 방어관련 유전자가 농축된 분획은 PCR을 이용하여 증폭시키고 같은 과정을 2회 계속하여 정상적인 식물과 저항성반응을 보이는 식물에 공통적으로 존재하는 유전자를 제거하고 병 방어관련 유전자를 농축하여 plasmid vector에 클론하여 무작위로 일부의 염기서열을 결정하고 데이터 베이스에 조회하여 신규 유전자 여부를 검증하였다.

식물의 병저항성 반응시 특이적으로 발현되는 병발생관련 단백질 유전자

의 일종인 pathogenesis-related protein-1(Yun *et al.* 1999, *J. Plant Physiol.* 논문출판)과 Beta-1,3-glucanase(Yun *et al.*, 1996, *Molecules and Cells* 논문 출판) 유전자를 전신저항성을 보이는 야생종 담배 (*Nicotiana glutinosa*)에서 클로닝 하여 그 유전자 발현기구를 규명하고 이를 표지로하여 병 저항성 관련 유전자 발현을 조절하여 식물의 병저항성을 유도하는 물질을 탐색할 수 있는 체계를 확립 하였다(대한민국 특허 출원). 따라서, 식물의 방어관련 유전자 발현 유도물질을 탐색하기 위하여 위의 2개 유전자를 프로브로하여 그 작용기작을 알지 못하면서 식물의 병저항성을 유발 하는 것으로 알려진 물질들을 스크리닝 한 결과 그중 β -aminobutyric acid, CuSO_4 및 NaHPO_4 등의 화합물이 병저항성 관련 유전자를 유도발현 시킴을 확인 하였다.(그림 1. Yun *et al.* 1996, *Molecules and Cells* 논문 출판).

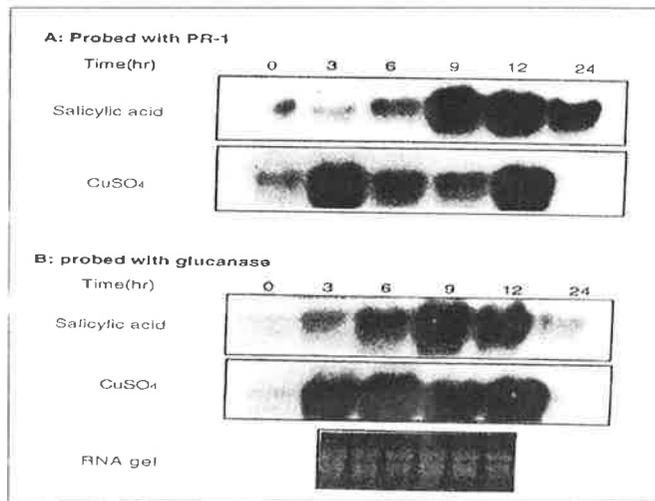


그림 1. Differential expression of two pathogenesis-related protein genes after treatment with copper sulfate and salicylic acid. Tobacco plants were sprayed with 2 mM SA, CuSO_4 and leaf tissues were taken at the indicated times and hybridized with ^{32}P labeled PR-1 of β -1,3-glucanase cDNAs.

2. 식물병저항성 기작연구 및 저항성관련 유전자 클로닝

식물의 병저항성 기작연구는 새로운 식물보호제 개발을 위한 타겟을 찾는 데 매우 중요한 역할을 하고 있다. 본 연구팀은 식물의 병저항성 기작을 분자수준에서 규명하고 그 지식을 새로운 농약개발에 이용하기 위하여 병저항성 반응 특이적 발현유전자 확보 및 그 발현조절기구 연구를 수행하였다. 병저항성 특이적 발현유전자 클로닝을 위하여 TMV 와 담배를 모델로 식물체에 인위적인 전신 저항성 반응을 유도한후 여기서 분리한 mRNA를 이용하여 cDNA library 를 제작하고 이 library를 건전식물에서 분리한 과량의 mRNA와 subtraction hybridization 하여 병저항성 반응을 보이는 식물체에만 특이적으로 발현되는 유전자를 클로닝 하였다. 일련의 연구를 통하여 표 1 과 같은 식물의 병저항성 관련 유전자가 확보되어 병저항성 반응과 이들 유전자의 발현조절및 병저항성 반응 에서의 이들 유전자의 역할 등을 연구하고 있다.

표 1. Subtraction hybridization 방법에 의하여 확보된 식물의 병 방어관련 유전자.

Clone #	Name of gene	Size(bp)
KC-3	Pathogenesis-related protein-1	500
KC-9	Metallothionein	521
KC-10	Trypsin Inhibitor Protein	500
KC-19	Catalase	1620
KC-26	Beta-1,3-glucanase	800
KC-27	SAR 8.2	400
KC-37	Diphenol Oxidase	450

이 중 metallothionein 유전자는 식물의 병저항성 반응중에 유도발현 되는 새로운 사실이 확인되어 유전자특허에 출원중 이며, 식물의 상처 스트레스 및 병원체에 의한 병저항성 반응과정 에서의 발현 등의 내용은 논문 출판 (Choi, et al. 1996, *Plant Physiology*),

3. PCR 기법을 이용한 가지과 작물에서의 병저항성 유전자 클로닝 방법

1) 실험재료 및 방법

가) 효소 및 시약 : 제한효소와 T4-ligase, Taq DNA polymerase는 Boehringer Mannheim으로 부터 구입하여 일정조건아에서 사용하였으며, PCR을 위한 oligonucleotide는 바이오니아(주)로 부터 구입하였다. RNA분리와 Northern bolt hybridization을 위한 시약들은 주로 Sigma 및 특급시약을 구입하여 사용하였다. DNA 분리와 probe 정제를 위한 kit는 QIAGEN제품을 사용하였으며, 클로닝 vector는 Novagene의 T-vector를 사용하였다. Probe labelling 을 위한 α -³²P-dCTP는 Amersham에서 구입하여 사용하였다.

나) 특정유전자 증폭 및 클로닝 : Template로 필요한 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN(담배), *Capsicum annum* cv. 부강 (고추), *Lycopersicon esculentum* (토마토) genomic DNA는 Witham et al. (1994)에 따라 분리하였다. Oligonucleotide 제작은 위 세종간의 chitinase, phenylalanine ammonia lyase, peroxidase의 염기서열을 Gene bank 의 data base로 부터 유출하여 비교분석하므로써 상호간의 homology가 있는 부분을 선별하여 다음과 같이 주문제작하였다.

ChitF 5'-ATG GGC AAC AGC ACC AGA TGG-3'

ChitR 5'-CCA AGC CAC CAT TGA TGA TG-3'

PALF 5'-CGA GTT GCA GCC TAA GGA-3'

PALR 5'-AGT CCA AGC TTG GAT TCC-3'

APOD 5'-CAG GTG CAC ACA CAT TTG-3'

APOD 5'-CAT CCT TAT TGG AAT TGC C-3'

PCR은 각각 100 ng genomic DNA를 template로 하고 100 pmole primer, 100 μ M dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 5U/ μ l Taq DNA polymerase를 0.5U 가 되도록

첨가한 뒤 다음과 같은 조건하에서 시행하였다. 95℃에서 5분 (precycle); 95℃에서 30초, 52℃에서 30초, 72℃에서 1분 (30cycle) ; 72℃에서 7분 (last cycle)이다. 증폭된 DNA는 sPCR purification kit로 정제한 후에 T-vector에 클로닝하였다. Fluorescent를 이용한 Dye-terminator sequencing 을 이용하여 염기서열을 분석한 후에 NCBI Blast search로 각각의 유전자를 비교한 결과 담배의 peroxidase, chitinase, PAL, 고추와 토마토의 chitinase, PAL 유전자가 클로닝되었음을 확인하였다.

다) 시료의 처리와 harvest : Probe로 사용될 각각의 유전자가 TMV처리 후 온도변화에 대하여 mRNA level의 expression, suppression, resistance에 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN에 0.5%의 TMV 접종원 (0.5g severely infected dry tissue per 100 ml water)으로 접종하였다. 식물체를 32℃에서 30시간 생육시킨 후, 24℃로 온도변화를 주었으며, 각각 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30시간마다 담배잎을 harvest 하였다. 비교식물체는 물을 처리하였으며, 위와 같은 동일한 시간으로 harvest 하였다.

라) Total RNA 분리와 Northern blot hybridization : Total RNA는 Parish와 Kirby (1966)에 따라 harvest된 잎으로부터 분리하였다. Total RNA 농도를 분광광도계로 정량한 후, 20 µg의 RNA를 formaldehyde가 포함된 1% agarose gel에 전기영동하였으며 nytran membrane으로 transfer하였다. 담배의 PR-1, β-1,3-glucanase, metallothionein-like gene, proteinase inhibitor, 감자의 HMG-CoA Reductase 3과 새로이 클로닝된 담배의 chitinase, PAL, peroxidase의 DNA를 32P로 landom prime labelling (Ausubel et al., 1987)한 후 50% formamide가 포함된 5X SSC에서 hybridization하였다. 이후, membrane washing은 5X SSC와 criterion으로 washing 하였으며 film으로 노출시킨 다음 developer와 fixer로 현상하였으며 동량의 RNA가 loading되었는지 알아보기 위하여 0.04% methylene blue가 포함된 0.5M sodium acetate 용액에서 염색하였다.

마) 병저항성 유도물질 및 감염억제 물질의 탐색 : 살균제인

probenazole과 KC는 10% acetone으로 녹이고 시중에 판매되는 β -aminobutyric acid는 물로 녹였다. *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN에 접종한 후 24°C에서 24시간 생육시킨 다음 harvest하여 RNA blot hybridization 하였으며, probe로는 병 저항성관련 표지유전자인 PR-1을 이용하였다. Total RNA 분리와 Northern blot hybridization method는 위의 방법과 같다.

2) 연구 결과

가) 담배 chitinase, PAL, peroxidase와 고추, 토마토의 chitinase, PAL의 클로닝

Nicotiana tabacum cv. Samsun NN genomic DNA를 templat로 하고 제작된 primer ChitF와 ChitR, PALF와 PALR, APODF와 APODR을 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 500 bp의 DNA fragment를 agarose gel로 부터 분리하여 T-vector에 클로닝한 후, fluorescent를 이용한 dye-terminator sequencing으로 분석하여 NCBI Blast search data base로 유전자를 확인하였다.

나) 담배 병 저항성 관련 유전자의 발현

Nicotiana tabacum cv. Samsun NN에 0.5% TMV inoculum으로 접종한 후, 32°C에서 3시간 유지한 후 24°C로 옮겨 시간별로 harvest 하였고 Northern blot hybridization한 결과 PR-1, PAL, HMGR3, chitinase는 9시간 부터 증가되는 형태를 보였으나 Beta-1,3-glucanase 비교 실험군과 별 차이를 보이지 않았다. APOD와 metallothionein-like gene은 control보다 TMV 감염 부위에서 억제되는 형태를 보였다.

다) 병 저항성 유도물질 및 감염억제물질의 탐색

살균제인 probenazole과 KC, 시중에 판매되는 Beta-aminobutyric acid를 담배에 각각 5, 50, 200 ppm으로 처리한 뒤 시간별로 잎을 채취하여 Northern blot hybridization 한 결과 각각 12 시간부터 PR-1 gene이 발현됨을 알수 있었다. Positive control로 사용된 0.2mM BTH와 2mM SA에 의해서도 같은 양상의 PR-1 유전자가 발현됨을 확인하였다.

4. 병저항성 유도물질의 탐색

1) 실험재료 및 방법

가) 균주 선별 및 보존 : 식물의 성장 촉진 활성을 보이는 31종의 세균과 13종의 곰팡이로부터 식물이 병 저항성을 나타낼 때 유도되는 유전자를 marker로 하여 병저항성 유도물질을 생산하는 균주를 선별하였다. 세균은 1/10 강도의 nutrient broth, 28°C에서 2일간 배양한 후 동량의 Ethyl acetate로 추출하였다. 원액의 3ml에 해당하는 추출액을 20% Acetone 액에 녹여 담배 잎 하나에 바르되 24 시간 후 sampling 하여 marker gene induction (PR-1a protein)을 조사하였다. 곰팡이는 PD broth, 26°C에서 5일간 배양한 후 위와 같은 전 처리 후 활성을 조사하여 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 20% glycerol 액과 혼합하여 -70°C freezer 에 보관하며 실험에 이용하였다.

나) 균주 배양 : 500 ml Erlenmeyer flask에 50 ml의 배지를 넣고 1일간 전배양한 후 배지 1 L 를 넣은 5 L baffled flask에 2.5% (v/v) 수준으로 접종하고 rotary shaker (150 rpm)를 이용하여 28°C에서 세균은 2일간, 곰팡이는 5일간 진탕배양하여 병 저항성 유도물질의 분리에 이용하였다.

2) 실험 결과

가) 식물내생세균의 확보 및 1차 스크리닝

Auburn 대학의 Kloepper 교수로부터 분양받은 식물내생세균 (endophytic bacteria) 을 배양하여 병 저항성 유도물질 생산여부를 1차 검정하였다. 31개 균주 배양액의 추출물을 스크리닝한 결과 15개의 균주 배양액에 병저항성 관련 표지 유전자인 PR-1 유전자의 발현을 증가시키는 물질이 존재함을 확인 하였다 (그림 2). 이중 두개의 균주 (JM8, JM19)를 선별한 후 재 실험을 통하여 병 저항성관련 유전자의 발현을 증가시키는 물질의 존재를 재확인하였으며, 병 저항성 유도물질의 분리를 위하여 JM8 균주를 선택하여 대량배양하였다.

JM 2 5 11 12 13 17 18 19 23 24 28 29 30 31 SA CK



Treatment(JM) SA CK 2 8 19 28 29 30

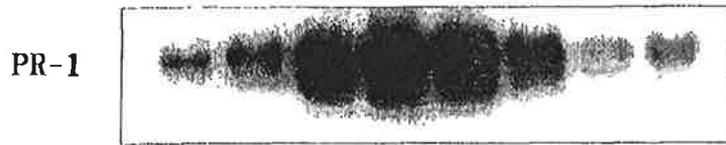


그림 2. Endophytic bacteria가 생산하는 병 저항성 유도물질의 1차 스크리닝.

: 500ml Erlenmeyer flask에 50ml 의 Nutrient Broth를 넣고, 28℃에서 2일간 배양한 후 동량의 에틸아세테이트로 추출하여 원액 3ml 상당의 유기용매층을 감압하에서 건조하고, 20% acetone 용액에 녹여 각각의 샘플을 담배잎 하나에 발라 24시간 우 샘플링하였다. 각각의 담배잎으로부터 total RNA를 분리하여 northern blot hybridization으로 병저항성 관련 유전자의 발현을 조사하였다. CK: control, 20% acetone 용액

나) JM #8 균주가 생산하는 병 저항성 유도물질

세균 JM #8 배양액으로부터 활성물질을 분리하기 위하여 발효액을 에틸 아세테이트로 2회 추출한 후, 유기용매층을 감압하에서 농축 건조하여 1.04g의 oily material을 얻었다. 이 물질을 silica gel column chromatography를 행하여 7개의 분획으로 분리하여 두 active ractions (I, V-VI)을 얻을 수 있었다. 여기서 강한 활성을 보인 I fraction을 메탄올에 녹인 후 메탄올을 eluent로 사용하여 Sephadex LH-20 chromatography하였다. 활성분획만을 농축한 후에 HPLC (YMC-Pack C18 SH-243-5, 250X21.2mm, 100% CH3CN

4ml, UV 205nm)하여 4개의 fractions으로 분리하여 활성을 보이는 순수한 물질들을 얻을 수 있었다. V-VI fractions은 메탄올에 녹여 C18에 흡착 시킨 후 10% 메탄올-90% 물 용액에서부터 100% 메탄올까지 용리하여 활성 물질을 얻었다 (그림 3)

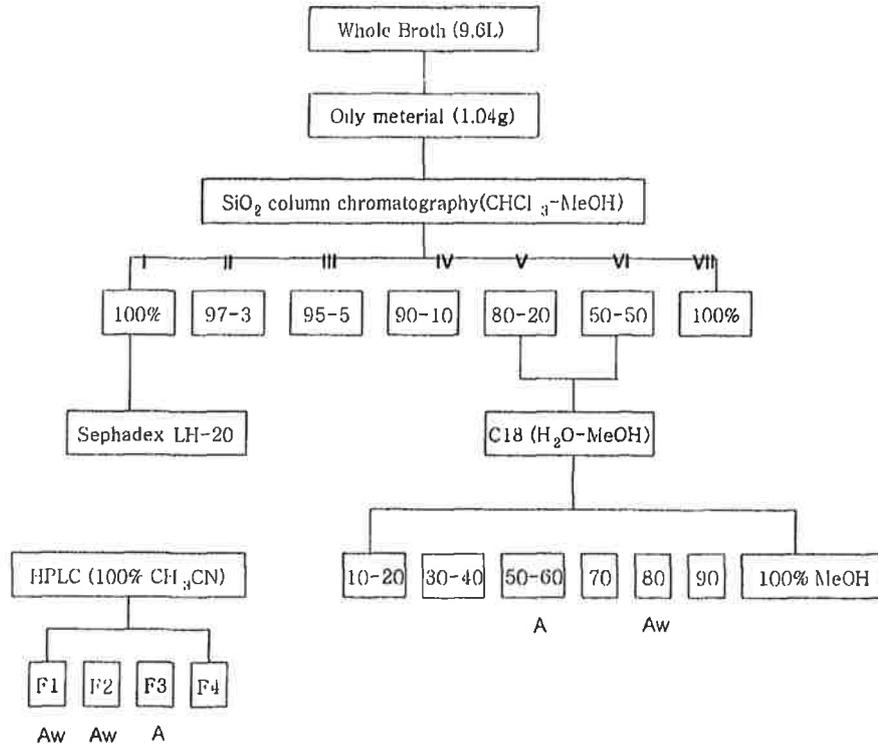
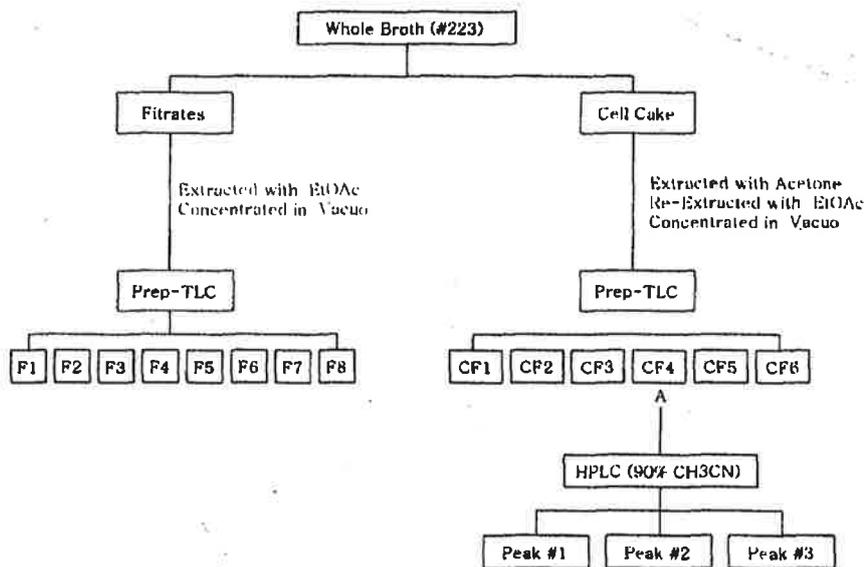


그림 3. JM #8 균주가 생산하는 병 저항성 유도물질 분리과정 및 Prep-TLC 분석의 생물활성검정

나) 곰팡이 균주 (#223, #301, #425)가 생산하는 병 저항성 유도물질 식물생장을 촉진하는 곰팡이 중에서 병 저항성 유도활성을 나타내는 균주들을 선별한 후 발효액으로부터 병 저항성 유도물질을 분리하기 위해 각각 4.8L 씩의 발효액을 filtration (Whatman paper #2)하여 균체와 배양액으로 나눈 후 유기용매로 추출하였다. 각 유기용매층은 감압하에서 농축, 건조 후 preparative Thin Layer Chromatography를 행하여 몇 개의 분획으로 나눈 후 병저항성 유도 활성을 조사하였다(그림 4, 5, 6).

(1) #223 균주가 생산하는 병 저항성 유도물질의 분리



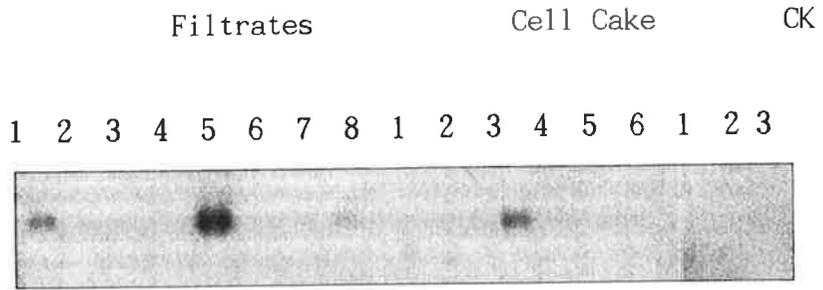
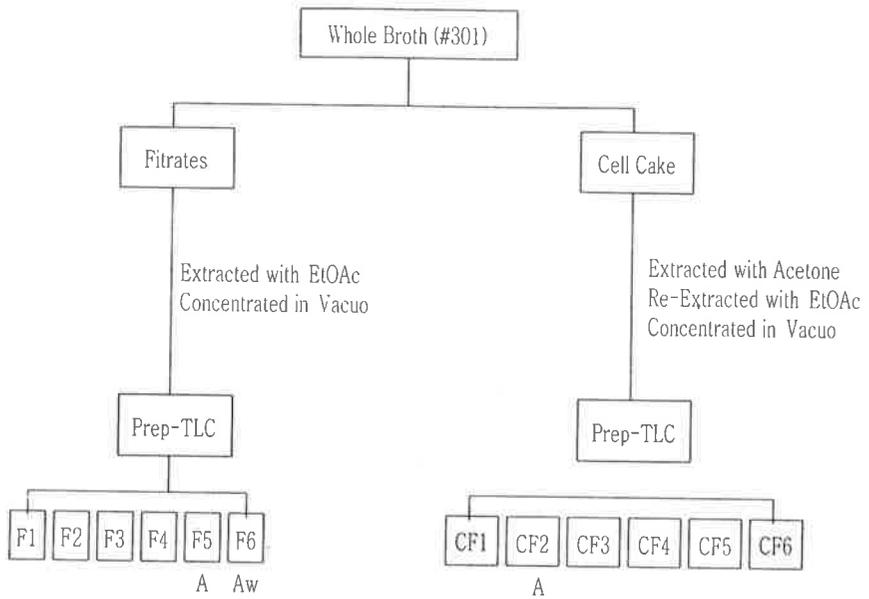


그림 4. #223 균주로부터 병저항성 유도물질의 분리과정 및 Prep-TLC 분획의 생물활성검정

A : Active fraction

(2) # 301 균주가 생산하는 병 저항성 유도물질의 분리



Treatments F1 2 3 4 5 6 CF1 2 3 4 5 6 CK

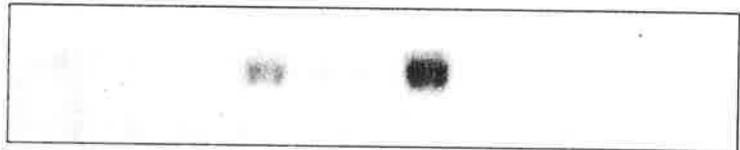


그림 5. #301균주가 생산하는 병 저항성 유도물질의 분리과정과 Prep-TLC 분획의 생물활성 검정

A : Major active fraction, Aw : Weak active fraction

(3) # 425 균주가 생산하는 병 저항성 유도물질의 분리

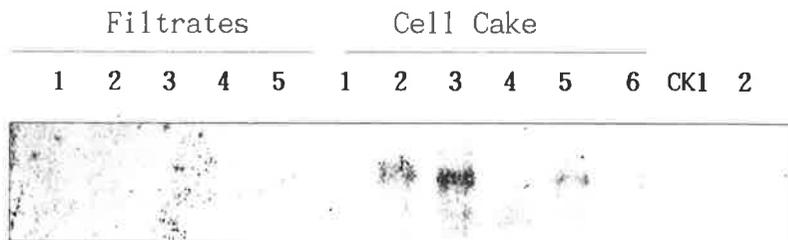
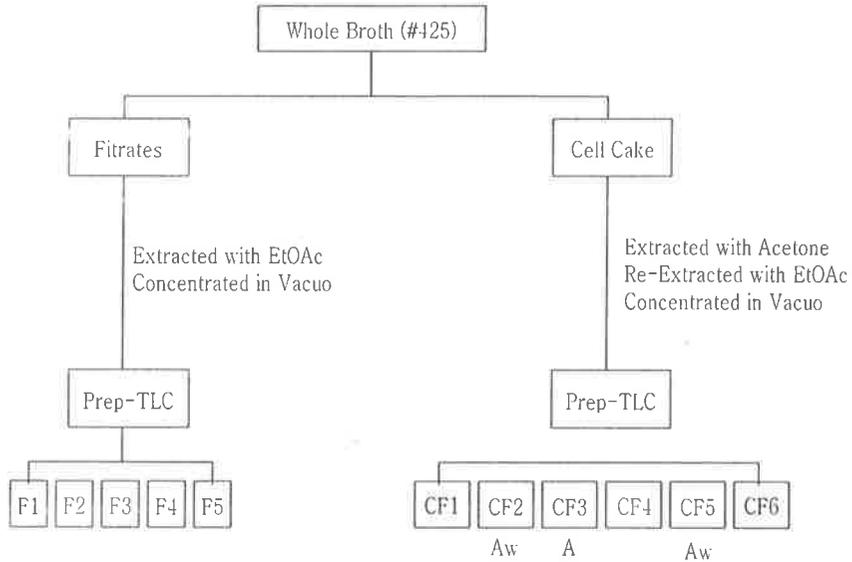


그림 6. #425 균주가 생산하는 병 저항성 유도물질의 분리과정 및 Prep-TLC 분획의 생물활성검정. A : Major active fraction, Aw : Weak active fraction

5. 2차 선발균주(JM-8)인 *Bacillus polymixa* 로부터 병저항성 유도 물질의 생산조건 및 분리연구

일반적으로, 토양 및 각종 균원으로부터 분리된 균주 중 특정 물질을 생산하는 것으로 선별되면, 물질의 구조 분석 및 기타의 실험에 이용하기 위해 많은 양의 물질이 필요하다. 이러한 물질의 양을 다량 확보하기 위하여, 필요한 물질을 많이 생산하도록 균주의 최적발효조건을 검토하였다.

가. 실험 재료 및 방법

1) JM-8 균주의 병저항성 유도물질 생산 조건 검토

병저항성 관련유전자의 발현을 증가시키는 유도물질을 생산하는 것으로 선별된 JM-8 (세균) 및 곰팡이 균주 중 JM-8 균주로부터 생산되는 물질을 대량 분리하여 구조 분석 및 기타의 실험에 이용하고자 통계적 방법등을 이용하여 생산 조건을 조사하였다.

2) Plackett-Burman Method

전통적으로 사용되어지는 방법은, 먼저 한 개의 인자를 고정시켜놓고 여러 인자들을 고정시킨 인자와 개별적으로 조합한 후 그 중 가장 좋은 활성을 나타내는 배합을 일차 선정한다. 일차 선정된 두 인자의 조합은 다시 두 인자간의 농도별 조합으로 재검토하여 두 인자간의 가장 적절한 농도를 선정하게 된다. 이러한 방법은 두 셋의 인자일 경우에는 적당하지만, 인자가 많아질 경우는 한번에 행할 수 있는 실험 기기 등의 부족과 적은 인력으로는 감당을 하기에 매우 어렵게 된다. 따라서, 일단 검토해야할 가능한 모든 인자들을 통계적 방법에 따라 고안한 배치에 따라 조합하여 특정 물질의 생산이나 활성에 큰 영향을 주는 주요인자를 구별해 내는 plackett-burman 방법은, 일단 많은 양의 물질을 확보해야하는 실험에 있어 매우 적절하다고 생각되어져 이 방법으로 JM-8 균주의 물질 생산조건을 검토하고자 하였다.

나. 연구결과 (병저항성 유도물질의 생산 조건 검토)

Endophytic bacteria에 관련된 문헌에 인용된 배지성분과, 실험에 이용되고 있는 균주가 식물내에서 분리되었다는 점에 착안하여 몇 개의 실

험인자들 선별하여 표 2과 나타낸 바와 같이 각각의 인자에 대해서 높은 농도와 낮은 농도를 설정한 후 Plackett-Burman 방법에 이용되어지는 matrix중에서 12인자에 맞는 것을 선택하였다. (표 3)

표 2. Factors(Ingredients) selected for Plackett-Burman method

Conc.	Corn		Glycerol	NaCl	Yeast		Cornsteep powder	Pharmamedia	Culture time
	starch				Extract				
High (+)	2%	2%	2%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	3days	
Low (-)	0	0	0	0	0	0	0	2days	

Basal Media :	Malt extract	0.5%
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10mg/L
	MnSO ₄	10mg/L

표 3. Plackett-Burman design for 12 trials

Trial	Corn starch	Dummy 1	Glycrol	Dummy 2	NaCl	Dummy 3	Yeast extract	Corn steep powder	Dummy 4	Pharmacia	Culture time	측정값 (at 3day)
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	19.8
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	2.6
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	2.4
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	2.6
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	10.7
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	6.7
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	31
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	100
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	14.5
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	6.6
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	1.2
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5

각각의 Trial이 하나의 배지가 되는 것이며, 12개의 배지가 이 실험의 한 세트가 된다. Dummy 인자는 실제로 배지상에 아무것도 첨가되는 것이 아니고, 실험의 오차를 계산하기 위한 인자이다.

각 배지(#1-#12)에서 나온 측정값은 각 인자의 (+), (-)에 해당하는 측정값으로 구별되고, 한 개의 인자당 모든 (+)에 해당하는 측정값의 평균에서 모든 (-)에 해당하는 측정값의 평균을 뺀 값이 그 인자가 측정값에 미치는 효과값이 된다. 여기에서 측정값은 효소의 활성, 균체량 등 매우 큰 오차 없이 측정할 수 있는 어느 것이라도 관계가 없으며, 이 실험에서는 Northern-Blot analysis를 행한 X-ray film을 densitometer로 읽은 상대적인 측정값을 각 인자의 효과를 조사하는데 이용하였다. 효과값은 플러스값일 수도, 마이너스값일 수도 있으며, 높은 +값은 그 인자가 좋은 영향을 주고 있는 것으로 해석할 수 있다.

표 3에서의 각 배지로 JM-8균주를 접종량이 1%되게 접종하여 2일, 3일에 각각 회수하여 동량의 Ethyl acetate로 추출하여 농축한 후, 배양액 5ml에 해당하는 농축물을 0.5ml의 20% acetone용액에 녹여 담배잎에 붓으로 바르고, 24시간 후에 회수하여 전체 RNA를 분리하여 병저항성 관련 유전자인 PR-1a cDNA를 probe로 하여 Northern-Blot analysis를 행하였다.

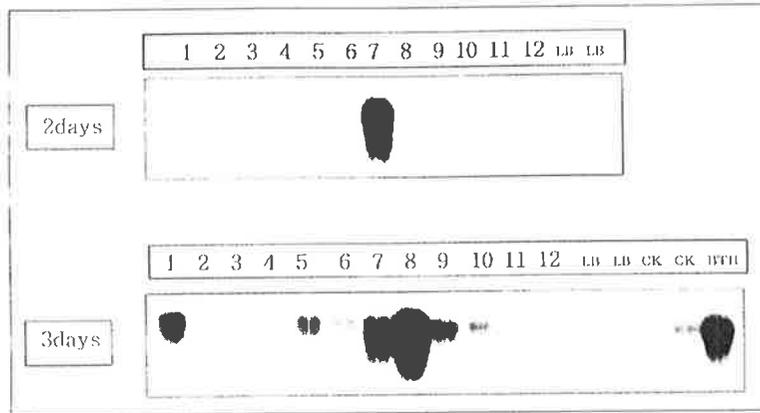


그림 7. Northern-Blot analysis (LB: Luria Bertani medium,
CK: Control, 20% acetone용액, BTH: 0.2mM Benzothiadiazole)

각 Trial에 해당하는 상대적인 측정값을 가지고 통계적 방법에 따라 계산한 결과는 다음과 같다.

	Corn starch	Glycerol	NaCl	Yeast extract	Corn steep powder	Pharma-media	Culture time
Effect	18.03	-20.44	-10.46	-13.16	18	-3.33	16.26
$t_x(t$ test)	1.14	-1.3	-0.66	-0.83	1.14	-0.21	1.03

Effect = the difference between the average of the + and - responses

$$t_x = \text{Effect of each factor} / \text{standard error}$$

SE(standard error) = $\sqrt{V_{eff}}$, $V_{eff} = \sum (Ed)^2 / n$, Ed: dummy effect, n: 갯수

Plackett-Burman 방법의 본 목적은 실험에 이용된 인자들 중에서 good factors와 bad factors를 구별하여 좋은 인자로 선별된 것만을 선택하여 하나의 배지를 구성하여 재확인하고, 줄어든 각각의 인자들을 factorial 조합으로 해서 인자 상호간의 적절한 농도를 찾아가는 것인데, 이번 실험에서는 glycerol 과 yeast extract가 JM-8균주가 병저항성 유도물질을 생산하는데 있어 좋지 않은 인자로 나타났고, corn starch, corn steep powder, culture time이 비교적 좋은 인자로 구별되었다.

그런데 Plackett-Burman designs으로 만들어진 12개의 trial중에서 #8번의

경우 이미 결과적으로 좋다고 판별된 성분만으로 배지를 이루고 있고, #7 번의 경우에는 #8의 배지에 bad factor로 나타난 yeast extract와 not good factors로 생각되는 NaCl 과 Pharmamedia를 함유하고 있었고, 그림 7에서 3일째의 Northern-blot analysis결과는 극명한 상호 일치 관계를 나타내고 있어, #7과 #8번의 배지로 배양시간에 따른 병저항성 유도물질의 생산을 조사하였고, corn steep powder의 경우 각 종의 금속이온이 과량 첨가되어 있는 배지성분이므로 EDTA를 첨가하여 금속이온의 배지내 헤리정도가 병저항성유도물질의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

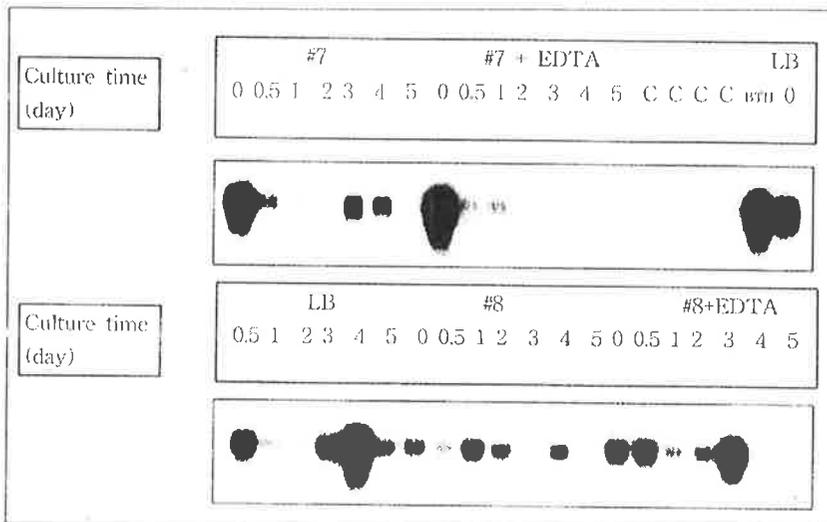


그림 8. Northern-Blot analysis

(LB: Luria Bertani medium, C: control, 20% acetone용액
BTH: Benzothiadiazole)

각각의 샘플링 시간에 회수된 배양액은 동량의 ethyl acetate로 추출하여 농축한 후 배양액의 5ml에 해당하는 농축물을 20% acetone용액에 녹여 담배잎에 바르고 24시간 후 회수하여 전체RNA를 분리하여 병저항성관련유전자인 PR-1a cDNA를 probe로 하여 northern blot hybridization을 하였다.

그림 8에서 보는 바와 같이 배지 자체내에서도 병저항성관련유전자의 발현을 유도하는 활성이 있는 것으로 나타나, 각 배지 성분을 검토한 결과 corn steep powder와 yeast extract의 함유성분이 활성을 밝혀졌으나,

XAD-7 column chromatography로 분획을 나누었을 때에는 전혀 유도활성을 보이지 않는 것으로 보아 몇 가지 성분의 복합적인 효과로 생각되어졌다. 물질을 분리하기 위해 초기에 JM-8균주의 병저항성관련유전자 유도물질의 생산용 배지로 이용되었던 LB배지는 4일째에 최고의 활성을 보여 기존의 2일째에 배양액을 회수하던 것이 잘못 되었음을 알았고, #7번 배지는 #8번의 배지에 비해 확실히 낮은 활성을 보여 Plackett-Burman 방법에서 판별된 good factors, bad factors가 유의성이 있음을 확인하였고, EDTA 첨가시 #8번 배지의 경우 최고활성을 보이는 시간이 하루가 빨라졌으며, 유도활성이 더 높아지는 것을 알수 있었다.

6. 기지의 화학물질 탐색을 통한 병저항성 유도물질선발

이미 구조를 알고있는 화학물질을 탐색하여 병저항성 유도물질을 선발하는 것은 여러 가지 측면에서 식물보호제 개발에 유리하다. 즉, 선발된 화합물의 화학구조를 이미 알고 있기 때문에 이를 직접 유도체를 합성하기위한 재료로 사용할 수 있으며 대량확보가 용이하기 때문에 여러 가지 후속실험(활성검정, 독성실험 등)을 용이하게 수행할 수 있다. 다음 표 4는 본연구를 통하여 시험한 기지의 화학물질의 리스트이며 각각의 화합물이 가지는 병저항성 관련 유전자 발현증진 효과를 표시 하였다.

표 4. 병저항성 유도물질 탐색방법을 이용한 화합물들 및 생물활성

시료(농도)	PR-1 유전자 발현 증진 유무
Salicylic acid (2 mM)	++
CuSO ₄ (10 mM)	++
Beta-aminobutyric acid (50 ppm)	++
BTH (0.2 mM)	+++
Chitosan (500 ppm)	+
Scopoletin (250 ppm)	++(?)
Aesculetin (250 ppm)	-
Umbeliferone (250 ppm)	-
4-Methylesculetin (250 ppm)	-
2,4-D (250 ppm)	++(?)
Indole butyric acid (250 ppm)	+++(?)
Ethephon (250 ppm)	++
Triadimefon (250 ppm)	+++

가. 실험재료 및 방법

1) 시료의 준비 및 식물체 처리 : 처리하고자 하는 화학물질 시료를 아세톤에 녹인 다음 이를 증류수와 희석하여 최종 30% 아세톤이 되게 시료를 준비하여 미술용 붓을 이용하여 한 개의 완전희 성숙된 담배잎에 바르고 처리 뒤 24시간 후에 잎을 sampling 하여 액체질소에 급속히 냉각하여 RNA 분리시료로 사용하였다. 대조로써 1% DMSO(negative control)과 Salicylic acid 2mM(positive control)을 처리하였다.

2) Northern blot 분석을 통한 유도발현물질 탐색 : 각 시료를 담배에 바른 다음 24시간 후에 수확하여 병저항성 반응 특이적 발현 유전자인 PR-1을 표지유전자로 하여 선별하였다. Total RNA는 Parish 와 Kirby(1966)에 따라 수확한 담배에서 분리하였다 Total RNA 농도를 분광광도계로 정량한 후, 20 μ g의 RNA를 formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에 전기영동한 다음, nytran membrane에 transfer시켰다. 담배의 PR-1 DNA를 32P-dCTP와 random priming kit을 이용하여 labelling한 후 50% formamide가 함유된 5xSSC에서 hybridization하였다. Membrane은 low stringency washing buffer와 criterion washing solution으로 washing 하였으며 X-ray film에 노출시킨 후 현상하여 pathogenesis-related protein-1 유전자의 발현을 마크로하여 처리한 시료들의 유전자발현 증진 여부로 병저항성 유도효과 여부를 검정 하였다.

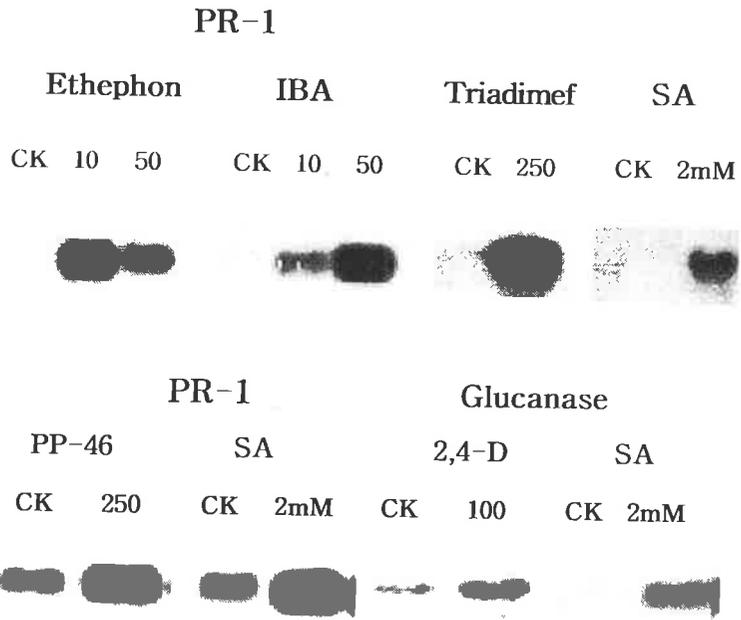
표 5. Scopoletin의 식물병 저항성 증진효과(억제효과)

Treatment	Treatment Days Before Inoculation	Control efficacy(%) against disease				
		RLB	RSB	TLB	CGM	BPM
BTH (0.2 mM)	1	0	0	38	0	13
	4	38	44	14	0	25
	7	44	13	23	0	50
Scopoletin (250 ppm)	1	6	0	16	0	0
	4	15	38	30	0	0
	7	19	6	0	0	25

RLB: Rice Leaf Blast(벼 도열병), RSB: Rice Sheath Blight(벼 문고병),
 TLB: Tomato Late Blight(토마토 역병), CGM: Cucumber Grey Mold(오이 잿빛곰팡이병), BPM: Barley Powdery Mildew (보리 흰가루병)

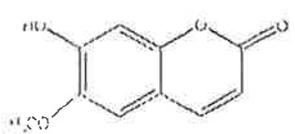
나. 연구결과

그림 3. 몇가지 선발된 화합물 및 내생균주에 의한 PR-1, Glucanase-유전자의 RNA blot hybridization 결과

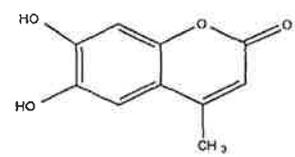


CK: 대조구, IBA: indole butyric acid, Triadimefon, SA:Salicylic acid, PP-46:선발균주

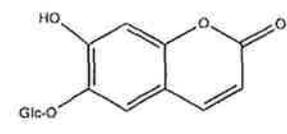
(재료 및 방법 참조)



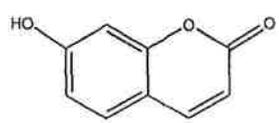
Scopoletin



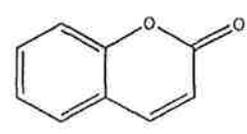
4-Methylscouletin



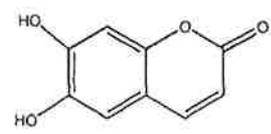
Scopolin



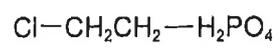
Umbelliferone



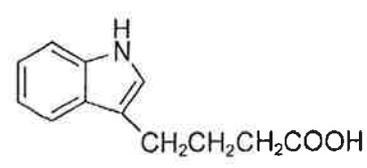
Coumarin



Aesculetin



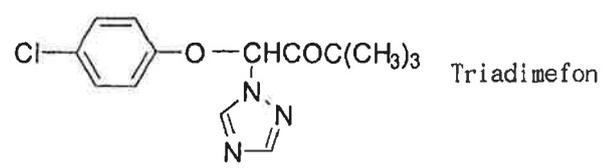
Ethepon



IBA



2,4-D



Triadimefon

그림 9. 본실험에 이용한 Scopoletin 유도체 및 기타 화합물들의 화학구조.

제 4 절 병 저항성 유도물질의 분리를 위한 미생물자원의 수집, 활성검정 및 분자기법을 이용한 병저항성 유도물질 탐색체계 개발

1. 연구목적

식물의 병저항성 기작연구는 새로운 식물보호제 개발을 위한 타겟을 찾는 데 매우 중요한 역할을 하고 있다. 본 연구에서는 식물의 병저항성 유도 및 감염억제물질의 탐색을 위한 유도물질 탐색재료 선발로써 식물과 상호관련한 저항성 유발 길항미생물을 선발하기 위한 체계를 확립하고자 이미 확보된 병저항성 반응특이적 발현유전자중 Pathogenesis-related protein 1 을 표지로 하여 1차 선발하는데 이용하고자 하였다.

2. 연구내용 및 결과

가. Endophytic bacteria의 분리

1) 실험재료 및 방법

가) 시료채취 : 식물의 병저항성을 유발하는 길항미생물(식물내생세균 : endophytic bacteria)을 선발하기 위하여, 전국 5개지역을 중심으로 식물을 채집하였다. 시료채취는 일년생 및 다년생의 작물을 비롯하여 잡초에 이르기 까지 다양한 식물종을 대상으로 채집하였다.

나) 균주분리 및 보존 : 식물의 병저항성을 유발하는 식물내생세균의 분리는 채취한 식물시료로부터 본 연구실의 선발방법을 이용하여 분리하였다. 식물체 뿌리를 흐르는 물에 2-3회 세척하여 뿌리표면에 묻어있는 토양 및 기타 잔재를 대략 씻어낸 다음, 3차 멸균증류수로 3회 세척한 후 70% 알콜에 10분간 침적 시켜 뿌리표면을 완전히 소독시킨다. 표면살균시킨 시료는 다시 3차 멸균증류수로 3회 세척하여 알콜을 완전히 제거시킨 후 풍건시킨다. Homogenizer를 이용하여 시료 0.2g과 3차 멸균증수 5ml를 혼합하여 조직을 마쇄시킨 다음, 선발배지(1/10강도의 MYP 배지)에 도말하여

28℃의 배양기에서 배양시켜 단일 콜로니를 분리하였다. 분리한 식물내생세균은 다시 여러차례 계대하여 순수분리하였다.

이렇게 순수분리된 식물내생세균은 20% glycerol 액과 혼합하여 -70℃ freezer에 보관하며 실험에 사용하였다.

2) 연구결과

식물내생세균 확보 : 전국 5개도에서 분리한 식물내생세균은 일년생 및 다년생의 작물 및 잡초로부터 분리하였으며, 1/10 강도의 MYP배지에서 1일 이내에 생육하는 균을 대상으로 분리하였다. 식물내생세균의 분리는 앞의 방법을 이용하였고, 순수분리된 세균은 20% glycerol 용액과 혼합하여 -70℃에 보관하였다.

가) 1차 수집

식물채집 지역(장소)	수집 식물	분리 균주
경상남, 북도	10 개 식물 - 일년생 및 다년생 작물 및 잡초	60 균주
전라남, 북도	23 개 식물 - 일년생 및 다년생 작물 및 잡초	120 균주
충청도 지역	12 개 식물 - 일년생 및 다년생 작물 및 잡초	80 균주
총 분리 균주	-	260 균주

나) 2차 수집

시료채집 장소	채집 식물 수	분리균주 수	비고
충청남도(공주, 부여 및 계룡산 일대)	24	55	
충청북도(괴산군, 청주시, 철원지역)	65	160	
전라남 북도(영광, 고창, 남원, 무안 등)	13	30	
계	102	245	

현재 식물과 상호관련한 균주는 500여 균주를 선발하였으며, 병저항성 관련 유도물질 탐색체계를 이용하여 1차 스크리닝을 실시하고 있으며, 6가지 식물병원균에 대한 보호효과조사를 실시하였다.

나. Endophytic bacteria 발효액의 in vivo screening (화학연구소에서 수행)

1) 연구내용

본 연구에서는 식물의 방어관련 유전자 발현 유도물질 및 감염억제제를 탐색하기 위한 in vivo 실험으로써 앞서 분리한 식물내생세균의 배양여액에 의한 식물보호 효과를 검증하기 위하여 5가지 식물 진균병원균에 대하여 1차 스크리닝을 실시하였다.

2) 실험재료 및 방법

가) 균발효액준비 : 앞서 분리한 식물내생세균의 배양을 위하여 250ml Erlenmeyer flask에 배지 50ml을 넣고 30℃, shaking incubator(150 rpm)에서 48시간 배양시킨다음, 배양여액을 원심분리하여 cell을 제거한 상층액을 이용하였다.

나) 대상 식물병: 병저항성 유도 물질 탐색을 위하여 스크리닝에 사용한 식물 병원균은 벼도열병균(*Pyricularia oryzae*, RCB), 벼잎집무늬마

름병균(*Rhizoctonia solani*, RSB), 오이잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*, CGM), 토마토역병균(*Phytophthora infestans*, TLB), 밀붉은녹병균(*Puccinia recondita*, WLR) 및 보리흰가루병균(*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, BPM)을 이용하였다.

다) 1차 스크리닝 방법: 벼도열병은 병원균인 *Pyricularia oryzae* KJ301 균주를 살겨 한천배지(Rice Polish 20g, Dextrose 10g, Agar 15g, 증류수 1 L)에 접종하여 25°C 배양기에서 2주간 배양하였다. 병원균이 자란 배지를 Rubber Polishman으로 배지표면을 긁어 기중 균사를 제거하고, 형광등이 켜진 선반(25~28°C)에서 48시간 동안 포자를 형성시켰다. 병접종은 분생포자를 살균증류수를 이용하여 일정농도의 포자현탁액(10^6 conidia/ml)을 만든 뒤 약제 처리된 낙동벼(본엽 2~3엽기)에 흘러내릴 정도로 충분히 분무하였다. 접종된 벼는 습실상에서 암상태로 24시간 놓아둔 뒤에 상대습도 80% 이상이며 온도가 26°C인 항온항습실에서 5일간 발병시킨 후 병반면적을 조사하였다.

벼잎집무늬마름병(RSB)는 적당한 양의 밀기울을 1 L 배양병에 넣고 멸균한 후 병원균인 *Rhizoctonia solani* AG-1 균주를 접종한 후 25°C 배양기에서 7일간 배양하였다. 병접종은 배양된 균사덩어리를 적당하게 잘게 마쇄하여 약제처리된 3~4엽기의 낙동벼가 자란 포트에 고르게 접종하여 습실상(25°C)에서 1일간 배양 후 상대습도 80% 이상인 항온항습실에서 4일간 발병을 시킨 후 병발생은 잎집에 발병된 병반면적율을 조사하였다.

잿빛곰팡이병은 병원균인 *Botrytis cinerea*를 감자한천배지에 접종하여 25°C 항온기(암상태)에서 7일간 배양한 후 하루에 12시간씩 광암을 교차하면서 다시 7일 동안 배양하여 포자를 형성시켰다. 병접종은 배지에 형성된 포자를 Potato dextrose broth로 수확하여 혈구계를 사용하여 포자농도를 10^6 conidia/ml로 만든 후 약제처리된 오이유묘(1엽기)에 분무접종하였다. 접종된 오이유묘는 20°C 습실상(상대습도 95% 이상)에 넣어 5일간 발병을 유도시킨 후 병반면적율을 조사하였다.

토마토역병은 병원균인 *Phytophthora infestans* KA2 균주를 V-8 juice

agar배지에 접종하여 20°C 항온기(암상태)에서 7일 동안 배양한후 광을 하루에 16시간씩 조사하면서 다시 7일 동안 배양하여 유주자낭을 형성시켰다. 병균집중은 형성된 유주자낭을 살균증류수를 첨가하여 수확하고 광학현미경하에서 혈구계로 포자농도를 조사하여 10^5 sporangia/ml의 포자현탁액을 만들어 13°C에서 2.5시간 동안 저온처리하여 유주자를 유출시킨 후 약제처리된 토마토 유묘(제 2-3엽기)에 분무접종하였다. 병균을 접종한 토마토 유묘는 20°C 습실상에서 48시간 습실처리한 후 20°C 항온항습실(상대습도 95%이상)로 옮겨 3일간 발병시킨후 병반면적율을 조사하였다.

밀붉은녹병(WLR)은 병원균인 *Puccinia recondita*는 활물기생균이므로, 실험실에서 식물체에 직접 계대배양하면서 밀유묘에 형성된 하포자를 접종원으로 사용하였다. 균주의 약효조사를 위하여 일회용 포트(직경 : 6.5cm)에 5립씩의 밀종자(품종:조광)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 일엽기 밀유묘에 약제처리를 하고 1일 동안 풍건시킨후 포자현탁액(포자 0.67 g/L)을 분무접종하였다. 접종된 밀유묘는 20°C의 습실상에서 1일간 습실처리한 후에 상대습도가 70%인 20°C의 항온항습실로 옮겨서 발병을 유도하고 접종한지 7일 후에 병반면적율을 조사하였다.

보리흰가루병(BPM)은 병원균인 *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*는 활물기생균이므로, 실험실에서 보리유묘로 계대배양하면서 보리유묘에 형성된 포자를 접종원으로 사용하였다. 약효조사는 일회용 포트(직경 : 6.5cm)에 5립씩의 보리종자(품종:동보리)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 제1엽기 보리유묘에 약제를 살포하고 1일 동안 풍건시킨후 약제처리된 보리에 흰가루병 포자를 털어 접종하였다. 접종된 보리유묘는 20~23°C, 상대습도 50% 정도의 항온항습실에 두어 7일간 발병시킨후 병반면적율을 조사하였다.

라) 약제의 조제 및 처리: 배양여액의 상층액은 Tween-20 용액(250ppm)에 희석하여 50ml을 준비한다. 처리는 각 대상병당 2pots씩 총 12pots를 turn table위에 놓고 회전시키면서 spray gun($1\text{kg}/\text{cm}^2$)으로 식물체 전체가 골고루 약제가 부착되도록 살포한다음 약제처리된 식물은 48시간동안 풍건

시킨 후 병원균을 접종한다.

3) 연구결과

1차 분리한 균주중 95균주를 선발하여 6가지 식물병원균에 억제효과를 조사 하였다. 식물내생세균은 250ml Erlenmeyer flask에 배지 50ml을 넣고 30℃, shaking incubator(150 rpm)에서 48시간 배양시킨다음, 배양여액을 원심분리하여 cell을 제거한 상층액을 Tween-20 용액(250 ppm)에 희석하여 각 식물체에 분무 처리한 후 48시간 동안 풍건 시킨후 병원균을 접종하여 얻은 결과는 표 6과 같다.

처리 균주중 16개 균주가 매우 우수한 보호효과를 보였으며, 특히 잣빛곰팡이균을 억제하는 능력이 현저하게 확인되었다. 16개 균주중 3개균주가 병저항성 관련 유전자인 PR-1 을 유도하였다. 또한 PR-1 유전자를 유도하는 식물내생세균중 잣빛곰팡이병 및 토마토 역병에 대하여 억제효과를 보이는 균주도 다수 확인되었다.

표 6. 식물내생세균의 배양여액에 대한 식물병 억제효과 검정

No. of isolates	Control value(%)						Remark
	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM	
PP-3	0	15	77	5	13	8	
PP-4	0	10	41	5	36	0	
PP-5	0	0	89	29	63	8	
PP-6	0	15	61	5	77	0	
PP-8	0	10	80	17	27	16	
PP-9	0	15	83	17	63	16	
PP-10	0	50	61	47	72	41	
PP-11	0	0	83	17	36	50	
PP-12	0	5	83	17	54	0	
PP-13	0	0	48	5	45	0	
PP-14	0	0	77	11	81	33	
PP-15	0	0	48	5	86	71	
PP-16	0	0	61	5	72	33	
PP-17	0	0	83	17	77	33	
PP-18	0	0	88	17	81	41	
PP-21	90	75	96	76	97	91	
PP-22	83	90	96	90	100	95	
PP-23	95	90	94	89	100	91	
PP-24	0	0	67	5	68	16	
PP-25	0	15	41	5	72	0	
PP-26	95	85	97	89	99	94	
PP-27	0	5	77	64	72	8	
PP-28	0	0	85	17	81	8	
PP-29	71	90	94	85	100	95	
PP-31	0	20	41	0	77	0	
PP-32	86	90	96	90	100	94	
PP-33	0	20	89	0	72	0	
PP-34	0	0	22	0	63	0	
PP-35	0	5	3	0	54	0	
PP-36	75	55	93	73	98	96	
PP-37	0	20	48	0	63	0	

* RCB : 벼 도열병균, RSB : 잎집무늬마름병균, CGM : 잣빛곰팡이병균,
 TLB : 토마토 역병 균, WLR : 밀녹병균, BPM : 보리 흰가루병균

No. of isolates	Control value(%)						Remark
	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM	
PP-38	0	5	9	0	36	0	
PP-39	0	0	89	0	40	0	
PP-40	0	10	41	0	72	0	
PP-41	0	35	88	0	72	0	
PP-42	0	10	9	0	72	0	
PP-43	0	0	22	0	77	0	
PP-44	25	0	9	23	81	0	
PP-46	16	90	92	23	97	97	
PP-47	0	5	93	5	86	8	
PP-48	0	40	89	5	79	76	
PP-49	0	0	67	5	90	41	
PP-50	0	25	22	5	54	0	
PP-51	0	0	48	5	27	0	
PP-52	0	0	41	17	72	16	
PP-53	0	0	35	58	18	8	
PP-54	0	0	83	64	77	25	
PP-55	0	0	29	35	63	0	
PP-56	0	0	79	29	17	8	
PP-57	0	0	76	29	79	0	
PP-59	16	0	11	17	17	0	
PP-61	0	0	41	5	44	0	
PP-62	0	5	70	23	17	16	
PP-63	0	10	58	17	3	16	
PP-64	80	75	90	58	94	16	
PP-65	86	90	97	52	96	0	
PP-66	8	0	29	0	31	0	
PP-67	0	30	23	17	72	0	
PP-68	16	0	47	11	58	41	
PP-69	0	0	64	5	58	0	
PP-70	0	0	58	5	51	0	
PP-71	0	0	52	5	37	0	

No. of isolates	Control value(%)						Remark
	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM	
PP-72	0	0	29	11	13	0	
PP-73	0	5	70	5	41	0	
PP-74	0	0	85	17	37	0	
PP-75	0	0	64	29	24	0	
PP-76	0	5	89	41	37	0	
PP-77	0	0	47	17	51	0	
PP-78	0	0	64	17	17	0	
PP-79	0	5	82	35	24	0	
PP-80	0	0	52	41	48	33	
PP-81	0	0	85	5	65	0	
PP-82	71	20	94	5	96	71	
PP-83	0	0	64	17	3	0	
PP-84	8	0	58	5	3	0	
PP-85	0	5	17	5	3	0	
PP-86	0	0	82	17	10	16	
PP-87	0	20	70	5	58	25	
PP-88	50	75	95	52	86	8	
PP-89	0	0	52	58	3	0	
PP-91	0	0	58	5	3	16	
PP-92	0	0	17	5	41	0	
PP-93	0	10	64	0	10	0	
PP-94	0	0	29	17	6	16	
PP-95	0	0	90	5	3	0	
PP-96	0	0	23	0	3	0	
PP-97	8	5	76	5	10	0	
PP-98	0	15	17	29	3	0	
PP-99	0	0	58	11	51	16	
PP-100	0	0	91	52	0	0	
PP-101	0	0	85	11	0	8	
CK	0	0	5	17	44	0	

다. Northern blot hybridization을 통한 병저항성 유도 발현물질 탐색

1) 연구 내용

본 연구에서는 병저항성 유도 및 감염억제물질의 탐색체계 확립을 위하여 이미 확보된 병저항성 관련 유전자를 이용하여 식물로부터 분리한 식물내생세균(Endophytic bacteria)을 식물이 병저항성을 나타낼 때 유도되는 Pathogenesis-related protein 1을 marker로 하여 1차 선별하는데 이용하였다.

2) 실험재료 및 방법

가) 균주배양, 추출 및 식물체 처리 : 앞서 순수분리한 세균은 L broth, MYP broth에 접종한 다음, 28°C의 rotary shaker(150 rpm)를 이용하여 48시간 배양한 후 동량의 Ethyl acetate로 추출하였다. 원액의 5ml에 해당되는 추출물은 1% DMSO에 녹인 다음, 담배 잎에 바르고 24시간후에 sampling 하였다. 대조로써 1% DMSO(negative CK)과 Salicylic acid(SA) 2mM을 처리하였고 일반 식물병원세균을 동일한 방법으로 배양한 다음 식물체에 처리하여 선별균주와 비교하였다.

나) Northern blot 분석을 통한 유도발현물질 탐색 : 각 추출액을 담배에 바른 다음 24시간 후에 수확하여 병저항성 반응 특이적 발현 유전자인 PR-1을 표지유전자로 하여 선별하였다. Total RNA는 Parish 와 Kirby(1966)에 따라 수확한 담배에서 분리하였다 Total RNA 농도를 분광광도계로 정량한 후, 20 μ g의 RNA를 formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에 전기영동한 다음, nytran memb.에 transfer시켰다. 담배의 PR-1 DNA를 32P로 random prime labelling한후 50% formamide가 함유된 5xSSC에서 hybridization하였다. Membrane은 low stringency washing buffer와 criterion washing solution으로 washing 하였으며 X-ray film에 노출시킨 후 현상하여 발현여부를 확인하여 선별하였다.

3) 연구결과

순수분리한 세균은 병저항성 유도 물질 탐색을 위하여 L broth(Tryptone 10g, yeast ext. 5g, NaCl 10g, pH 6.8, water 1L) 또는 MYP broth(Glucose 5g, Beef ext. 5g, NaCl 1g, Yeast ext. 1g, K₂HPO₄ 0.5g, Poly peptone 5g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, pH 6.8, water 1L)배지 5ml에 접종하여 30°C, shaking incubator(150 rpm)에서 2일간 배양시켰다. 배양액을 유기용매로 추출하기위하여 동량의 Ethyl acetate를 교반시킨후 물층과 유기용매층으로 추출하여 건조시켰다. 유기용매층의 추출물을 이용하여 병저항성 관련 유도물질 탐색여부를 검정코자 500 μ l의 1% DMSO 용액에 추출물을 녹인 다음, 담배잎에 처리하였다. 처리후 24시간째에 담배 잎을 수확하여 total RNA를 분리한 후 PR-1 probe를 ³²P로 labelling한 후 Northern blot hybridization 하였다. 그결과는 그림 11과 같다. 총 260여 균주중 식물내생세균 89균주, 일반 식물병원세균 7균주를 대조구로이용하였으며, 대조 약제로는 salicylic acid 2mM 을 처리하였다. 89개 내생세균중 20균주가 SA처리시 유도되는 signal보다 강하거나 비슷한 수준에서 유도되었다. 분리된 세균중 대부분 Bacillus spp(Bs)., Pseudomonas spp.(Pa, Pf)이었으며, Xanthomonas, Agrobacterium등 다양한 세균종에서 유도되었다. 현재, 1차 선발된 식물내생세균은 재현성을 위한 2차 실험을 수행중에 있다.

또한 대조구로 이용한 일반 식물병원세균 중에서 두균주에서 유도되었으며, 그중 *Agrobacterium tumefaciens* (AT)와 *Xanthomonas compestris* pv. *compestris* (Xc)가 유도되었고, 나머지 5 의 식물병원세균에서는 유도되지 않았다.

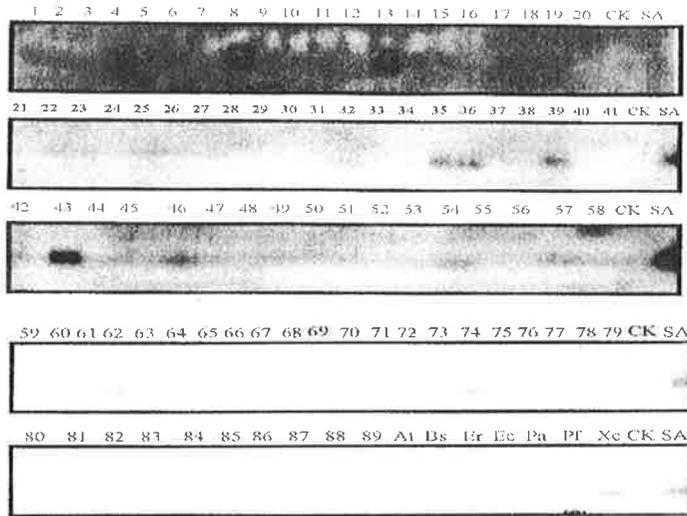


그림 11. RNA blot hybridization을 이용한 병저항성 유도물질의 1차 스크리닝 결과

제 5 절 병 저항성 유도 물질의 간이 대량 검정을 위한 in vitro 탐색 및 형질전환 식물을 이용한 활성물질의 탐색체계 개발

식물체가 고유하게 가지고 있는 병원체의 방어기작이 최근 들어 속속 밝혀지고 있다. 이에따라 다수의 병저항성과 관련하여 발현하는 생체 방어관련 유전자가 분리되고 그 특성 및 기능이 규명되고 있다. 본과제는 이러한 식물의 병저항성 반응에 관하여 본 연구실에 축적된 지식과 Know-How를 이용하여 작물의 병저항성을 인위적으로 유도할 수 있는 식물보호소재를, 식물과 상호작용하고 있는 미생물, 천연물 또는 이미 알려져 있는 화합물을 탐색할 수 있는 체계를 만들고 이를 이용하여 새로운 기공의 식물보호제를 탐색 하고자 하였다.

가. 병저항성 유도물질의 간이 대량검정을 위한 in vitro 탐색체계를 위한 형질전환벡터 제작

1. 연구수행 내용 및 결과

1) 연구내용

식물의 병저항성 기작연구는 새로운 식물보호제 개발을 위한 타겟을 찾는데 매우 중요한 역할을 하고 있다. 본 연구팀은 식물의 병저항성 기작을 분자수준에서 규명하고 그 지식을 새로운 식물보호제개발에 이용하기 위하여 병저항성 반응 특이적 발현유전자인 PR-1의 promotor와 결합된 Glucuronidase reporter gene을 식물체내에 형질전환 하였으며, 이를 이용하여 병저항성을 나타낼 때 반응하는 체계를 이용하여 많은 시료를 대량으로 스크리닝하고 빠른 시간내에 1차 스크리닝 할수 있는 장점을 이용하고자 병저항성 유도물질이 특이적으로 생산될 때 발현되는 형질전환 식물배양세포를 제작하였다.

2) 실험재료 및 방법

가) PR-1a 프로모터의 클로닝 : *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN(담배)의 genomic DNA를 template로 이용하여 PCR를 수행하였다.

Oligonucleotide 제작은 PR-1a의 염기서열을 Gene bank의 data base로 부터 유출하여 비교분석하여 primer를 제작하였다. PCR반응에 사용한 primer은 PR-1a의 upstream region인 -1532 ~ -1510 부위로 5'말단에 HindIII site를 넣은 5'-GGAAGCTTGGACTAAGATATACGAGGATGTC-3'와 +7 ~ +31 부위에 상보적인 염기서열의 5'말단에 BamHI site를 넣은 5'-GGGGATCCGACTATAGGATAAATGTTGTATCT-3'을 사용하였다. 95℃ 1분 (denaturation), 60℃ 30초(annealing), 72℃ 1분(polymerization) 조건으로 30 cycle로 증폭하였다. 증폭된 DNA는 PCR purification kit로 정제한 후 T-vector에 클로닝한 후 sequencing하여 확인하였다.

나) 식물형질전환 벡터 제작 : 식물형질전환 벡터인 pBI121을 기초로 하여 pBI121으로 부터 CaMV 35S 프로모터 부분을 HindIII/BamHI으로 절단한 다음 앞서 제작한 PR-1a프로모터와 교체하여 제작하였다.

3) 연구 결과

가) 식물형질전환 벡터 제작

Nicotiana tabacum cv. Samsun NN(담배)의 genomic DNA를 template로 이용하여 PCR를 수행하였다. Oligonucleotide 제작은 PR-1a의 염기서열을 Gene bank의 data base로 부터 유출하여 비교분석하여 primer를 제작하였다. PCR 반응은 95℃ 1분(denaturation), 60℃ 30초(annealing), 72℃ 1분(polymerization) 조건으로 30 cycle로 증폭하였다. 증폭된 DNA는 PCR purification kit로 정제한 후 T-vector에 클로닝한 후 sequencing하여 확인하였다(data not shown). 식물형질전환 벡터인 pBI121을 기초로 하여 pBI121으로 부터 CaMV 35S 프로모터 부분을 HindIII/BamHI으로 절단한 다음 앞서 제작한 PR-1a프로모터와 교체하여 제작한 다음 HindIII/BamHI으로 절단하여 PR-1a 프로모터가 삽입되었음을 확인하였다.

나) 형질전환

앞서 제작한 PR-1a/GUS fusion vector (그림 12)를 electroporation을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입하였다. PR-1a/GUS를 가

진 *Agrobacterium*를 *N. tabacum* cv. Samsun NN 의 잎과 27℃에서 24시간 공동배양하고 멸균중류수로 3회 씻어 *Agrobacterium*을 제거하고 kanamycin과 carbenicillin이 각각 200µg/ml 및 500µg/ml의 농도로 포함된 callus 유도용배지에 치상하여 callus를 유도하였다.

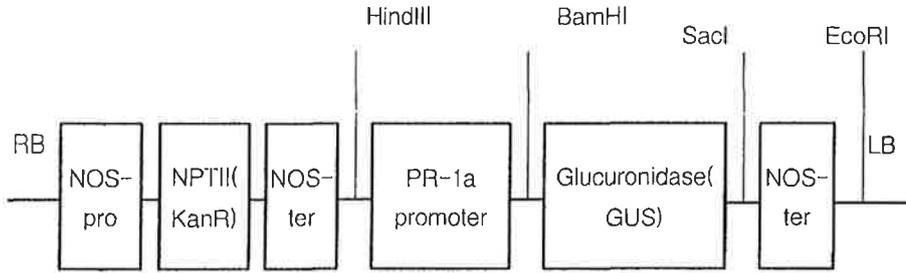


그림 12. 식물배양세포를 이용한 병저항성 유도물질 대량스크리닝체계 개발을 위한 식물체내 유전자발현 벡터

나. 병저항성 유도물질의 간이 대량검정을 위한 in vitro 탐색체계를 위한 형질전환 식물체 제작

1. 연구목적

식물체가 고유하게 가지고 있는 병원체의 방어기작이 최근 들어 다양한 방법에 의해 밝혀지고 있다. 이에 따라 다수의 병저항성과 관련하여 발현하는 생체 방어관련 유전자가 분리되고 그 특성 및 기능이 규명되고 있다. 또한 식물의 병저항성기작 연구는 새로운 식물보호제 개발을 위한 타겟을 찾는 데 매우 중요한 역할을 하고 있다. 본 연구에서는 식물의 병저항성 유도 및 감염억제물질의 탐색을 위한 기술개발로써 배양세포를 이용한 탐색체계개발, 무사마귀병 억제 및 생육촉진 미생물선발, 바이러스감염 억제물질탐색을 수행 하였다.

2. 연구 내용 및 결과

1) 실험재료 및 방법

가) 식물재료 및 처리 : 본 실험에 이용한 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN(담배)은 16 시간씩/1일 광이 조사되는 25-30℃의 온실에서 10

주간 재배한 다음, 형질전환 식물 및 배양세포를 유기하는 재료로 이용하였다. 그리고 유기된 형질전환 식물체 또는 식물배양세포에서 PR-1 유전자 및 기타 생체방어 관련유전자의 발현여부를 조사하기 위하여 plant activator 인 salicylic acid 와 CuSO_4 를 처리한 후 northern blot hybridization 분석을 하였다.

나) 형질전환 벡터제작 및 형질전환 식물체 형성 : 식물형질전환 벡터인 pBI121을 기초로 하여 pBI121으로부터 CaMV 35S 프로모터 부분을 HindIII/BamHI으로 절단한 다음 본 실험실에서 제작한 PR-1a 프로모터와 교체하여 제작하였다(Figure 13). 이와같이 제작된 PR-1a::GUS fusion vector를 electroporation을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입한 후, PR-1a::GUS를 가진 *Agrobacteria*를 *N. tabacum* cv. Samsun NN의 잎과 27°C에서 24시간 공동배양하고 멸균종류수로 3회 씻어 *Agrobacterium*을 제거하고, kanamycin과 carbenicillin이 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함된 callus 유도용배지 및 shoot 유도용 배지에 치상하여 유도하였다.

Construction of PR-GUS reporter system

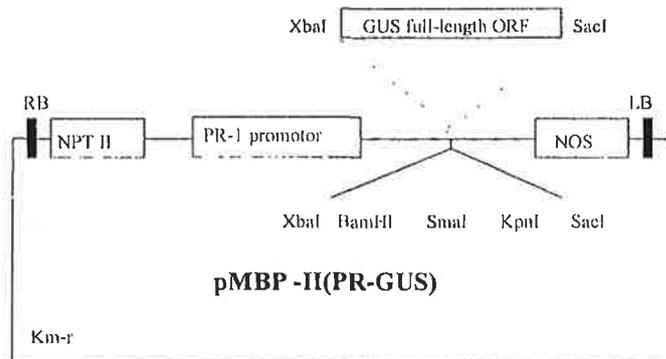


Figure 13. Construction of PR-GUS reporter system for screening plant disease resistance-inducing substances.

다) 배양세포 유지 : MS1D (MS medium, 1mg/1L 2,4-D) 고체배지에서 유지된 callus로부터 MS1D 액체배지에서 현탁배양을 유도하였다. 약 25 ml 의 배지가 들어 있는 250 ml 삼각 플라스크에 캘러스 5 g을 접종하고 26°C, 80 rpm의 shaking incubator에서 지속적인 광을 조사하면서 형질전환 식물의 세포를 현탁배양하였다(진행중). 또한 형질전환 되지 않은 담배식물의 조직을 앞의 방법과 동일하게 callus를 유도한 다음 액체현탁배양 시켰다. 이와 같이 배양된 담배세포는 7일간격으로 계대하면서 실험에 이용하였다.

라) RNA 분리 및 Northern blot hybridization : 담배현탁배양세포에 salicylic acid를 농도별로 처리한 후 12시간째 그리고 CuSO₄는 100 μM를 처리한 다음 시간별로 현탁세포를 수확한 total RNA를 분리하였다. 즉, 담배현탁세포를 vacumm pump을 이용하여 배지성분을 제거한 후 액체질소와 함께 유발로 완전히 마쇄한 후 Total RNA 농도를 분광광도계로 정량한 후, 20μg의 RNA를 formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에 전기영동한 다음, nytran memb. 에 transfer 시켰다. 담배의 PR-1 및 기타 생체방어 관련 유전자의 cDNA를 ³²P로 landom prime labelling한 후 50% formamide가 함유된 5x SSC에서 hybridization하였다. Membrane은 low stringency washing buffer와 criterion washing solution 으로 washing하였으며, X-ray film에 노출시킨후 현상하여 발현여부를 확인하였다.

마) 식물세포사멸 실험 : 담배현탁 배양세포에 100 μM의 CuSO₄를 처리한 다음 세포사멸을 조사하기 위하여 Evans blue stain 방법을 이용하였다. 현탁배양세포 100 mg/ml를 시간별로 수확한 다음 0.05%의 Evans blue 용액(0.5 ml)을 처리한 후 15분간 상온에 방치한 후 staining 되지 않은 시약은 증류수로 5회 이상 씻어내고, 50% methanol과 1% SDS를 처리한 후 50°C에서 30분간 incubation하여 추출하였다. 이와 같이 추출한 용액은 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포사멸정도를 측정하였다.

바) 물질 탐색을 위한 식물내생세균배양 및 탐색 : 병저항성 유도물질 탐색을 위하여 생명공학연구소에서 본 과제 수행을 위하여 순수분리한 세균은 현재 500여 균주이며 식물생육 및 병발생억제 조사를 위하여 496균주

를 MYP broth(Glucose 5 g, Beef ext. 5 g, NaCl 1 g, Yeast ext. 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, Poly peptone 5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, pH 6.8, water 1L) 에 접종한 다음 2일간 배양하여 실험에 이용하였다. 생물검정실험은 화학연구소에서 실시하였다.

2) 연구 결과

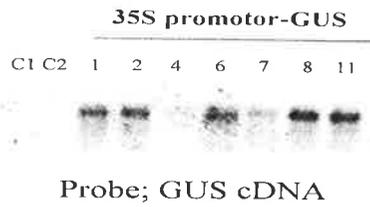
가) PR-GUS expression을 이용한 병저항성 유도물질 탐색체계 개발

식물배양세포를 이용하여 병저항성 유도물질 탐색체계를 개발하기 위하여 GUS reporter 유전자를 이용하였다. 그림 13은 35S-promoter에 의해 발현이 조절되는 GUS 유전자의 발현을 RNA 수준에서 모니터링 한결과(A)와 PR-1 promotor에 의해서 발현이 조절되는 GUS유전자 형질전환체의 효소 발현을 X-gluc을 이용하여 activity staining한 결과이다. 두가지 형질전환 벡터를 이용하여 형질전환된 담배를 각각 5개체이상 증식하여 종자를 채종 하였으며 병저항성 탐색체계를 위한 cell line 개발을 진행하고 있다.

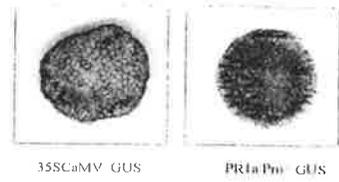
나) 살리실산 처리에 대한 식물배양세포의 반응

식물배양세포를 이용한 병저항성 유도 물질탐색의 가능성을 확인 하기 위하여 우선 형질전환되지 않은 담배의 배양세포를 개발하였으며 이 배양세포에 내재된 PR-1유전자가 병저항성 유도물질인 살리실산 처리에 의하여 발현이 증가 되는지 여부를 확인 하였다. 그림 14의 결과 250 μ M살리실산 처리시 12시간이내에 PR-1 유전자발현이 최대가 됨을 확인할 수 있었다. 이에 비하여 500 μ M이상 또는 100 μ M이하에서는 PR-1 유전자의 발현증가가 미비 하였다. 이 결과는 배양세포 에서도 살리실산 처리에 의하여 PR-1 유전자의 발현이 증가하고 이를 마커로 병저항성 유도물질 탐색이 가능할것임을 시사하는 결과이다.

A



B



C

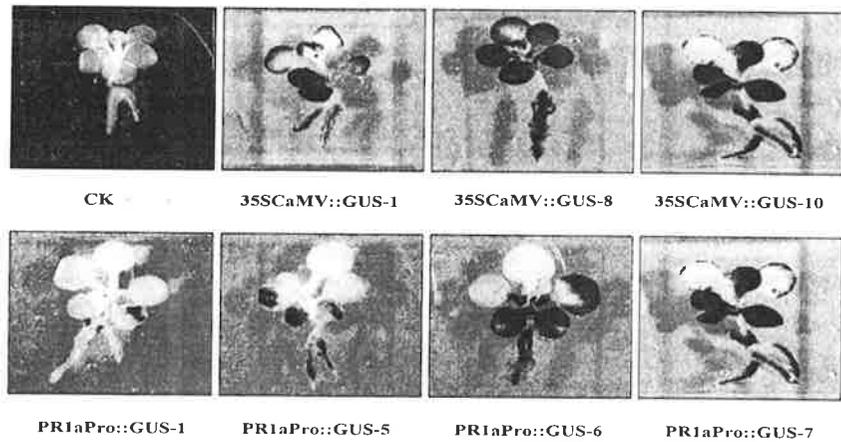


Figure 13. Transgenic expression of GUS reporter gene in tobacco.
 A: expression of GUS gene in selected transgenic plant. RNA samples were isolated from transgenic line without any treatment and hybridized with GUS cDNA probe.
 B: expression of GUS enzyme in transgenic tobacco. Gus activities were stained 24hr after 1mM SA treatment.
 C: Expression of GUS activity in selected transgenic T1 seedlings. GUS activities were stained 24hr after 250 μ M SA treatment.

SA treatment (μM)

CK 10 50 100 250 500



Probe; PR-1 (12hr after treatment)

Figure 14. Expression of PR-1 gene in tobacco cell suspension culture following treatment of salicylic acid. Tobacco cells(1 g) treated with SA were harvested 12 hr after treatment and RNA samples were prepared for Northern blot hybridization with PR-1 cDNA probe.

다) Oxidative burst and cell death in tobacco cell suspension culture by copper treatment

일반적으로 식물세포에 병저항성 반응을 유도하는 물질은 활성산소를 유발하여 신호전달을 시작 하는 것으로 알려져 있다. 일례로 잘 알려진 살리실산의 경우도 식물체내에 활성산소의 양을 증가 시키고 증가된 활성산소가 식물의 생체방어관련 유전자 발현을 증진 시키는 신호전달물질이 되는 것이 보고되어 있다. 본 실험에서는 활성산소 및 PR-유전자 발현을 증가 시키는 것으로 본 과제에서 확인 된 구리용액을 이용하여 구리처리에 따른 식물세포의 사멸과정을 조사 하였다. 여러 가지 조합의 농도처리실험을 통하여 100 μM 이 선정 되었고 이 농도의 구리용액처리에 따른 식물세포 사멸과정은 그림 15에 나타나 있다.

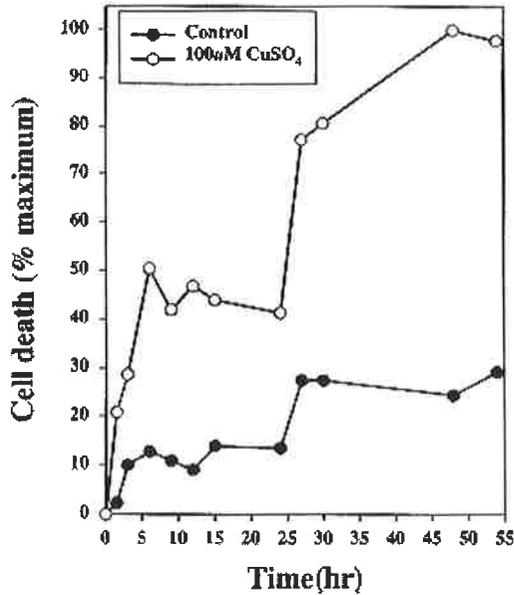


Figure 15. Cell death curve of tobacco suspension culture following treatment of CuSO₄. One week-old culture were treated with CuSO₄ (final 100 µM concentration) and cell death were monitored by Evans Blue staining.

라) 담배배양세포에서의 생체방어관련 유전자 발현

구리용액 처리에 의한 배양세포 사멸과정에서 생체방어관련 유전자의 발현을 처리후 시간대 별로 조사한 결과 조사한 5개의 유전자 발현중 4개의 유전자 발현이 증가하는 것으로 관찰 되었다(그림 16).

이중 특히 phenylalanine ammonia lyase 유전자와 glutathione-S-transferase 유전자의 발현이 두드러지게 증가 하였으며 이는 식물배양세포의 세포사멸 또는 과민성 반응의 마커로 이들 유전자를 표지로 사용할 수 있음을 의미하여 추후 병저항성 유도물질 탐색에 보조적인 유전자 재료로 사용 하고자 한다.

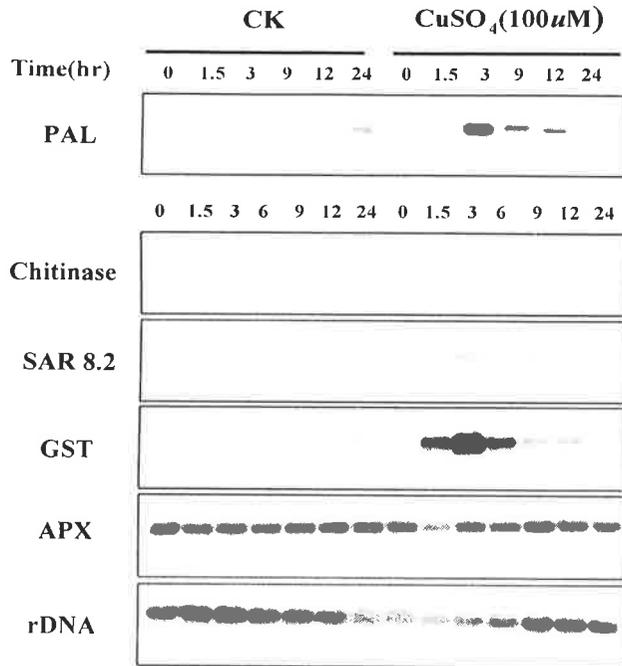


Figure 16. Expression of defense-related genes in tobacco cell suspension culture following treatment of CuSO₄. Cells were treated with CuSO₄ solution (final 100 μM) then 1 gram fresh weight was harvested at the indicated time in the figure for RNA isolation and Northern blot hybridization with 5 different defense-related gene probes.

마) 식물병원세균의 접종에 의한 담배배양세포에서의 생체방어관련 유전자 발현

배양세포에 담배에 병원성 또는 비병원성을 띠는 세균을 접종하여 인위적으로 반응을 유도 하고 4가지 생체방어관련 유전자의 발현을 조사 하였다. 그 결과 그림 17에서 보여지는 바와같이 SAR 8.2 유전자가 담배에 HR을 일으키는 병원체에 대하여 특이적으로 반응하는 것으로 나타 났으며 GST 유전자는 세포사멸과 깊은 상관 관계를 가지고 발현됨을 확인 하였다.

이 결과는 배양세포를 이용한 병저항성 유도물질 탐색을 위한 기초자료 및 탐색도구로 이용할 예정이다.

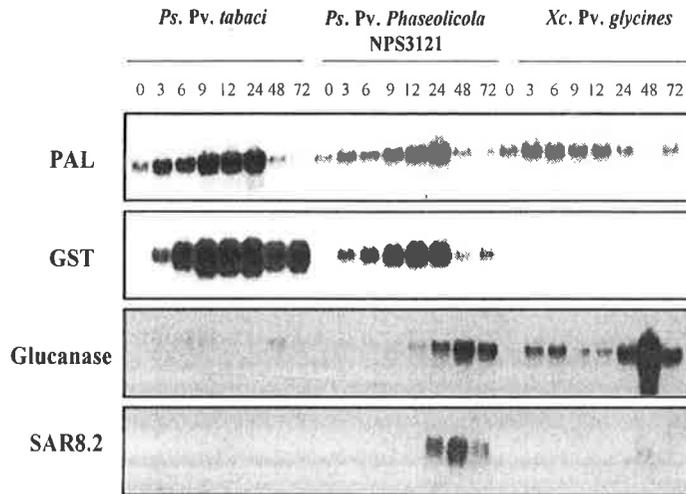


Figure 17. Expression of 4 different defense-related genes in tobacco cell suspension culture following inoculation of plant pathogenic bacteria. *P. syringae* pv. *tabaci*(pathogenic on tobacco), *P. s. pv. phaseolicola*(HR on tobacco), *X. campestris* pv. *glycines* (no response on tobacco).

마) Endophytic bacteria를 이용한 병저항성 유도물질 탐색

400여 균주의 Endophyte bacteria중 배추의 생장촉진 및 무사마귀 병 방제효과를 보인 20여균주의 배양액 추출물을 담배를 이용하여 병저항성 관련 유전자의 유도발현여부를 조사한 결과는 그림 18, 19, 20 과 같다. 20여균주를 순수분리한 다음 MYP broth (Glucose 5 g, Beef ext. 5 g, NaCl 1 g, Yeast ext. 1 g, K2HPO4 0.5 g, Poly peptone 5 g, MgSO4.7H2O, pH 6.8, water 1 L) 에 접종, 2일간 배양하여 동량의 Ethyl-acetate로 추출하였다. 추출물은 20% acetone에 녹인다음 담배식물에 처리한 후 30 시간째에 수확하여 전체 RNA를 분리하여 PR-1 및 PAL을 probe로 하여 병저항성 관련 유전자의 발현여부를 조사하였다. Negative control로는 1% DMSO 및 20% acetone을 처리하였고, positive control은 2mM SA와 0.15mM BTH를

처리하여 비교 분석하였다. 그결과, 20 균주중에 14개 균주를 1 차 선발하였고(그림 18), 14개 균주는 PR-1 유전자의 발현 여부를 재확인 실험하였다(그림 19). 2 차 실험으로 재확인하여 PR-1 유전자 발현 양상이 중복되는 3개의 isolates (PP-145, PP-242, 424)를 선발하여 이들 균주의 배양액을 다시 담배에 처리한 후 시간의 경과에 따라 PR-1 및 PAL 유전자 발현의 변화를 확인 하였다 (그림 20). 그 결과 두 균주 (PP-145, PP-424)를 선발하였다.

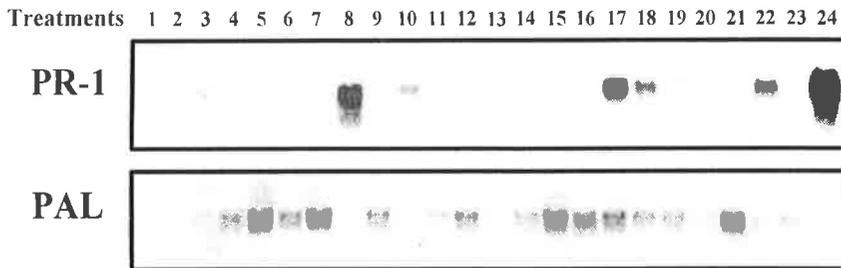


Figure 18. Expression of defense-related genes in tobacco plant following treatment of extract of the selected endophyte-bacteria. Tobacco plants treated extracts of 20 isolates were harvested 30 hr after treatment. RNA isolation and Northern blot hybridization with PR-1 and PAL cDNA probes.

Lane 1: Control (1% DMSO), 2: Control (20% acetone), 3: 2.5mM SA, 4: PP-521, 5: PP-221, 6: pp-424, 7: pp-194, 8: PP-145, 9: PP-222, 10: PP-131, 11: PP-217, 12: PP-271, 13: PP-484, 14: PP-218, 15: PP-272, 16: PP-242, 17: PP-242, 18: PP-224, 19: PP-174, 20: PP-157, 21: PP-483, 22: PP-213, 23: PP482, 24: 0.15mM BTH

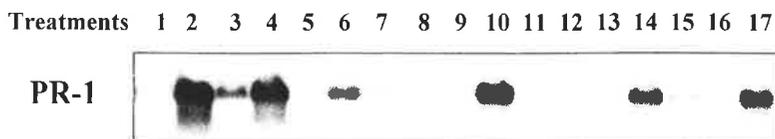


Figure 19. Expression of PR-1 gene in tobacco plant after 30 hr treatment of extract of the selected endophytic-bacteria.

Lane 1: CK (20% acetone), 2: 0.15mM BTH, 3: PP-218, 4: PP-224, 5: PP-213, 6: PP-145, 7: PP-242, 8: PP-157, 9: PP-174, 10: PP-424, 11: PP-271, 12: PP-131, 13: PP-221, 14: PP-194, 15: PP-483, 16: PP-272, 17: 2mM SA

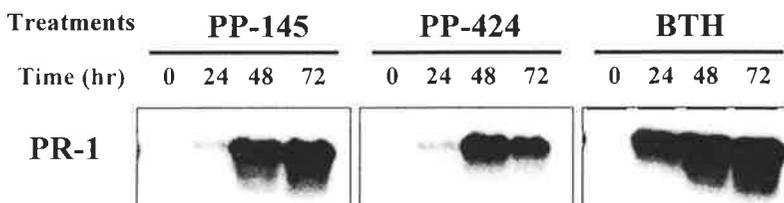


Figure 20. Expression of PR-1 gene in tobacco plant following treatment of extract of the selected endophytic-bacteria. Tobacco plants treated with extracts of two isolates were harvested at 0, 24, 48, and 72 hr after treatment and RNA samples were prepared for Northern blot hybridization with PR-1 cDNA probe.

제 6 절 형질전환 식물의 활용여부 및 세포사멸 및 기주 또는 비기주 저항성 반응으로 유도되는 생체방어관련 유전자 발현여부 조사

가. PR-1a promoter :: GUS expression system을 이용한 형질전환 식물의 활용여부조사

1. 연구 내용 및 결과

1). 실험재료 및 방법

가) 식물재료 및 처리

본 실험에 이용한 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (담배)은 16시간/1일 광이 조사되는 25-30℃의 온실에서 10주간 (7-8엽기) 재배한 다음, 형질전환 식물을 유기 하였고, 형질전환 식물체를 포함한 담배식물에서의 PR-1 유전자 및 기타 생체방어 관련유전자의 발현여부를 조사하기 위하여 TMV 및 식물세균 병원균을 접종한 후 Northern blot hybridization 분석을 하였다.

나) 형질전환 식물체 유도 및 형성

식물형질전환 벡터인 pBI121을 기초로 하여 pBI121으로부터 35S 프로모터 부분은 제한효소 (HindIII/BamHI)로 절단한 다음 본 실험실에서 제작한 PR-1a 프로모터와 교체하여 제작하였다. 이와 같이 제작된 PR-1a::GUS fusion vector를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain에 도입한 후, PR-1a::GUS를 가진 *Agrobacteria*를 *N. tabacum* cv. Samsun NN의 잎과 27℃에서 24시간 공동배양하고 멸균중류수로 3회 씻어 *Agrobacterium*을 제거하고, kanamycin과 carbenuicillin이 각각 100µg/ml 및 500µg/ml의 농도로 포함된 shoot 유도용 배지에 치상하여 유도하였다. Shoot가 유도된 형질전환 식물은 여러번의 계대배양 배지로 치상하여 전체 식물체를 형성시킨 다음, southern blot hybridization 분석을 하였다. 또한 형질전환 식물체의 종자 (T1)를 채종한 후 선택배지에서 유기되는 식물체를 이용하여 실험에 이용하였다.

다) 기주 및 비기주 병원체 접종에 의한 병저항성 유전자의 발현양상 비교

N. tabacum cv. Samsun NN (형질전환 식물) 및 Xanthi nc (control) 에 TMV (tobacco mosaic virus) 및 식물병원세균을 접종한 후 각각의 시간별로 담배잎을 수확하였다. TMV는 carborandum을 이용하여 상처접종을 하였고, 식물병원세균은 주사바늘이 없는 주사기를 이용하여 세균현탁액을 분압접종하였다. 본 실험에 이용한 식물병원세균은 기주관계에 있는 담배 들불병균 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528), 과 담배식물에 대하여 비기주 관계이며 과민감 반응 (Hypersensitive response: HR)을 일으키는 *Ps.* pv. *phaseolicola* NPS3121, *Ps.* pv. *syringae* 61 그리고 비기주 관계이며 과민감 반응을 일으키지 못하는 콩 불마름병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra)을 L broth media에서 배양하였다. 배양된 세균 현탁액중 *Ps.* pv. *tabaci* 11528은 5×10^4 cfu/ml과 나머지 세가지 병원세균은 $\sim \times 10^8$ cfu/ml을 멸균증류수에 현탁 시킨 다음, 담배잎 전체에 주사바늘이 없는 주사기를 이용하여 세균현탁액을 분압접종하였다(표 1).

표 7. Materials used in this study.

	Characteristic
Strains of pathogen	
Tobacco mosaic virus	Tobacco, Korea general strains
<i>Pseudomonas syringae</i>	
pv. <i>tabaci</i> 11528	Tobacco, wildfire disease; American type culture collection
pv. <i>syringae</i> 61	Wild type isolated from wheat. Bean; Nalr, HR-inducing in tobacco.
pv. <i>phaseolicola</i> NPS3121	Bean. Race 1; Rifr, HR-inducing in tobacco.
<i>Xanthomonas campestris</i>	Pepper and tomato. Wild type; Rifr. Non-HR and disease in tobacco.
pv. <i>glycines</i> 8ra	

Defense-related genes group

Pathogenesis-related protein genes	PR-1 (acidic form) PR-2 (acidic form, -1,3-glucanase) PR-3 (acidic form, chitinase) PR-4 (hevain-like protein) PR-5 (osmotin-like protein) SAR8.2
2nd metabolites-& oxidative burst- associated genes	PAL (phenylalanin amonia lyase) HMGR (3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase) GST (glutathion-S-transferase)
Cell-death related genes	<i>Ng</i> -CDM1 (<i>Nicotiana glutmosa</i> -cell death marker 1) Hin1 Hsr203J

라) RNA 분리 및 Northern blot hybridization

N. tabacum cv. Samsun NN (형질전환 식물) 및 Xanthi nc (control) 에 TMV (tobacco mosaic virus) 및 식물병원세균을 접종한 후 각각의 시간별로 담배잎을 수확하여 total RNA를 분리하였다. 수확한 담배잎은 액체질소와 함께 유발로 완전히 마쇄한 후 total RNA를 분리, 분광광도계로 정량한 후, 20 μ g의 RNA를 formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에 전기영동한 다음, nytran memb. 에 transfer 시켰다. 본 실험실에서 cloning 한 담배의 PR-1 및 기타 생체방어 관련 유전자의 cDNA를 ³²P로 random prime labelling 한 후 50% formamide가 함유된 5X SSC에서 hybridization 하였다. Membrane은 low stringency washing buffer와 criterion washing solution으로 washing하였으며, X-ray film에 노출시킨후 현상하여 발현 여부를 확인하였다.

2) 연구 결과

가) PR1a-GUS 형질전환 식물체의 형성 및 PR 유전자 발현여부 조사

형질전환 식물체를 이용하여 병저항성 관련 유도 발현여부를 조사하기 위하여 PR1a promoter::GUS gene을 fusion 시킨 담배 식물체를 형성시킨 다음, GUS reporter 유전자의 특성을 이용하였다. 그림 21은 PR1a promoter에 의해 발현이 조절되는 GUS 유전자 형질전환 식물체의 효소발현 (glucuronidase)을 X-gluc을 이용하여 GUS enzyme activity을 staining 하여 조사한 결과이다(A). 또한, 이들 형질전환 식물체내에 PR1a promoter::GUS vector의 삽입여부를 알아보기 위하여 GUS cDNA 유전자를 probe로 하여 southern blot hybridization을 실시한 결과 PR1a promoter::GUS 유전자를 삽입시킨 5, 6과 7번 형질전환line은 single copy로 도입되었으며, negative control로써 35S promoter::GUS fusion 형질전환 line 은 multi-copy로 도입되었음을 확인하였다(B). 마지막으로, 형질전환된 line 7번 식물을 이용하여 담배 식물 병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528 와 담배식물에 대하여 비기주 관계이며 과민감반응 (Hypersensitive response: HR)을 일으키는 *Ps. pv. syringae* 61을 접종하여 RNA 수준에서 PR1a 유전자의 발현여부를 조사한 결과, 0 hr부터 계속적으로 발현됨을 알수 있었다(C).

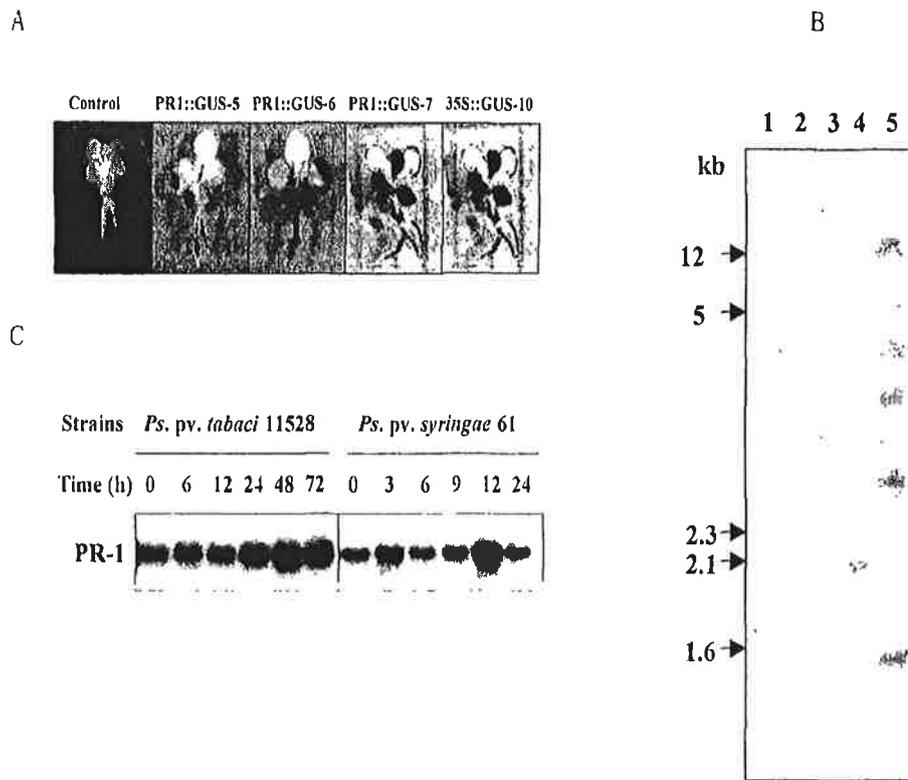


Figure 21. Transgenic expression of PR-1 and GUS reporter genes in tobacco.

A: Expression of GUS activity in selected transgenic T1 seedlings. GUS activities were stained 24hr after 250 μ M SA treatment. B: Southern blot analysis of the transgenic tobacco genomic DNA with GUS cDNA probe. Total genomic DNA (10 μ g/lane) from *N. tabacum* cv. Samsun NN and selected transgenic plant was digested with *Hind*III, respectively. Numbers shown in figure indicated the molecular length standards derived from *Hind*III digested λ bacteriophage DNA. Lane 1, cv. Samsun NN, 2. PRIa pro::GUS #5, 3. PRIa pro::GUS #6, 4. PRIa pro::GUS #7, 5. 35S CaMVpro::GUS #5. C: Expression of PR-1 gene in selected transgenic plant (line #7), RNA samples were isolated from transgenic line with two plant pathogenic bacteria, which induced disease symptom against *Ps. pv. tabaci* 11528 but elicited the HR against *Ps. pv. syringae* 61, and hybridized with PR-1 cDNA probe.

나) TMV 및 담배 병원세균 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 접종에 의한 세포사멸 및 기주저항성 반응으로 유도되는 생체방어관련 유전자 발현

식물 병원체 바이러스인 TMV와 병원세균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528 strain을 접종하여 인위적으로 병을 유발시킨 다음 세포사멸과 기주저항성 반응으로 유도되는 생체방어 관련 유전자의 발현여부를 조사하였다 (그림 22). 본 실험에 이용한 *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* nc (담배)는 TMV에 저항성 반응으로 상처접종후 약 48시간 후에 HR 병반을 나타내었고, 세균 접종시(5×10^4 cfu/ml)에는 약 48시간뒤에 약하게 황변되어 72시간이 경과하여 황변이 넓게 진전되는 것을 확인하였다(22A). 이들 조건하에서 본실험실에서 분리한 6개의 pathogenesis-related (PR) 유전자, 3개의 2차대사산물의 축적 및 항산화 관련 유전자, 그리고 세포사멸과 관련하여 발현되는 3개의 cDNA 유전자를 probe로 하여 northern blot hybridization한 결과는 그림 22B와 같다. 본 실험에서 사용한 12개의 유전자중에서, PR-유전자들은 TMV접종시에는 대개 세포사멸이 시작되는 전후로 하여 발현유도 되었지만 세균접종시에는 발현되는 시기가 약간씩 차이를 보였다. 하지만, 이들 모두 기주식물체계에서 저항성반응이나 감수성반응 모두에서 발현시기에는 약간의 차이가 있었지만 비슷한 양상을 나타내었다. 특히, PR-유전자들중 PR-1 유전자가 식물체가 사멸되는 시기를 전후로 하여 비슷한 시간대에 발현됨을 확인할 수 있었다. 더욱이, 2차 대사산물의 축적에 관련되는 phenylalanine ammonia lyase (PAL) 유전자와 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co-A reductase (HMGR) 유전자의 발현은 TMV 및 세균접종시에 나타나는 세포사멸시기와 유사한 시간대에 발현됨을 알 수 있었다. 그러나, glutathion-S-transferase (GST) 유전자는 TMV접종 (저항성 반응)시와 세균 접종 (감수성 반응)시에 발현유도는 비슷하였으나 발현유도되는 시간대에 있어서 차이를 보였다. 그림 22B에서 보여지는 바와 같이 GST 유전자가 저항성 반응을 보이는 TMV 접종시에는 3 및 6시간째에 매우 빠르게 발현되었다가 48시간째에 다시 발현되는 두 번의 발현양상을 보이는 반면, 감수성 반응을 보이는 세균의 접종시는 48 및 72시간째에 늦은 시간대에 강하게 발현되어다가 다시 120시간째에 다시 발현되는 양상을 보였다. 또한, 본 실험에서 세포사멸 또는 과민감 반응의 표지유전자로

세포사멸 관련 유전자를 probe로 하여 발현여부를 조사하였다. 그결과, Ng-CDM1 (*Nicotiana glutinosa*-cell death marker 1)은 TMV 및 세균접종 시에 HR 및 세포사멸과 관련하여 비슷한 시간대에 강하게 발현되는 반면 Hin1 유전자와 Hsr 203J 유전자는 TMV 접종시에는 세포사멸이나 과민감 반응이 나타나는 시간과는 다르게 매우 빠르게 발현됨을 보였주었다. 이는 Ng-CDM1 유전자의 발현이 Hin1 및 Hsr 203J 유전자와 비교하여 세포사멸이나 과민감 반응과 관련성이 있음을 보여주는 결과라 추측된다. 현재 형질 전환된 식물은 각 line 별로 종자를 수확하여 seed stock으로 보관중에 있다.

A

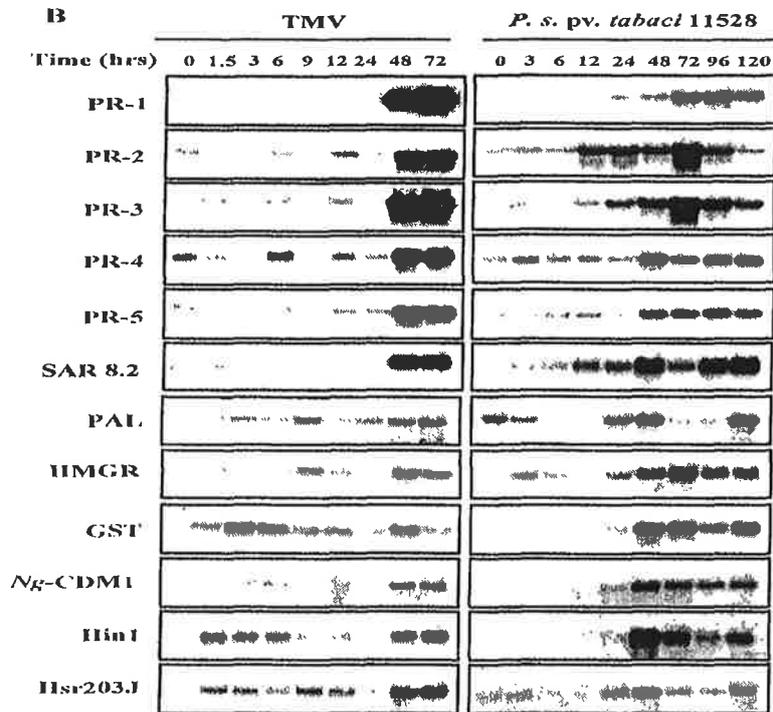
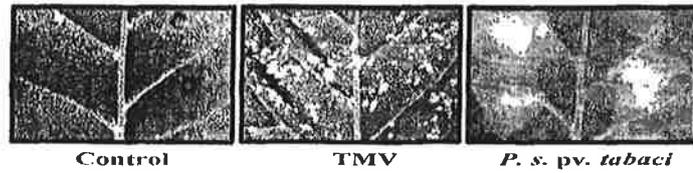


Figure 22. Disease and cell death, and expression of defense-related genes by host pathogen interactions. (A) Disease symptoms and cell death by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528 or TMV inoculation. Disease occurred 72 hr after inoculation of *P. s. pv. tabaci* and HR-cell death symptom elicited 48 hr after infection of TMV. Ten-week-old tobacco plants were inoculated with 5×10^4 cfu/ml bacteria cell after gently wounding methods, and were inoculated with sap prepared from TMV-infected tobacco.

(B) Time course expression of PR genes, second metabolites- and oxidative burst, and cell death related genes during disease and cell death of tobacco plant after pathogen (*P. s. pv. tabaci* 11528) and TMV inoculation. Tobacco plants were inoculated with these bacteria (5×10^4 CFU/ml) in distilled water, pH 6.8, by fully injected with needleless in leaves and were inoculated with TMV in distilled water (H₂O), pH 6.8, by gently rubbing the leaves with carborundum. Twenty μ g of total RNA samples were blotted on Nytran membrane and hybridized with ³²P-labeled cDNA probes.

PR 1, pathogenesis-related protein 1; PR-2, -1,3-glucanase; PR-3, chitinase; PR-4, hevein-like protein; PR-5, osmotin-like protein; PAL, phenylalanine ammonia lyase; HMGR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co-A reductase; GST, glutathion-S-transferase.

다) 식물병원세균의 접종에 의한 담배식물에서의 비기주저항성 반응으로 유도되는 급속세포사멸과 생체방어 관련 유전자의 발현

식물이 병원균의 침입으로부터 자신을 방어하려고 병저항성 반응을 유도하는 일환으로 많은 생체방어 관련유전자를 발현 유도하는 것으로 알려져 있으며, 앞의 그림 2에서도 그 결과를 확인할 수 있었다. 한편으로, 비병원성을 띄는 식물병원세균을 접종하여 인위적으로 세포사멸 및 과민감 반응 (HR)을 유도하고 앞서의 12가지 생체방어 관련유전자의 발현을 조사하였다. 그 결과 그림 23에서 보여지는 바와같이 *Ps. pv. phaseolicola* NPS3121와 *Ps. pv. syringae* 61 (1×10^8 cfu/ml)을 접종하였을 때 담배 앞에서 12 또는 24시간 이내에 과민감 세포사멸을 나타내었고, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra 에서는 아무런 세포사도 나타나지 않았다(23A). 또한, 이들 세포사멸이 일어나는 시기에 유도되는 생체방어 관련유전자의 발현을 조사한 결과는 그림 23B에 나타내었다. 이들 세균의 접종에 따른 6개의 PR-유전자의 발현은 TMV 및 *Ps. pv. tabaci* 11528 접종에 의한 발현과 비슷한 결과 얻을 수 있었으며, 흥미로운 결과는 세포사멸이나 과민감 반응(HR)이 일어나지 않은 *X. c. pv. glycines* 8ra를 접종한 처리구에서도 유사한 발현 양상을 보였다. 마찬가지로, PAL, HMGR 유전자 및 GST 유전자도 유사한 발현 양상을 보였다. 하지만, GST 유전자의 발현이 기주반응에서는 두 번의 발현 양상을 보인 반면에 비기주반응에서는 매우 초기 시간대에 발현되었다가 감소되는 상이한 결과를 얻을 수 있었다. 더욱이, 매우 흥미로운 결과는 세포사멸과 관련된 3개의 유전자에 대한 발현 양상이다. 그림 2B에서 보여지는 바와같이 *Ng-CDM1* (*Nicotiana glutinosa*-cell death marker 1) 유전자가 담배에 과민감 세포사멸 (HR)을 일으키는 병원균에 대하여 특이적으로 반응하는 것으로 나타났으며, *Ng-CDM1* 유전자가 기주반응에서 보여준 세포사멸 특이적인 것과 같이 과민감 세포사멸과 깊은 상관 관계를 가지고 발현됨을 확인 하였다. 반면에 *Hin1* 및 *Hsr 203J* 유전자는 HR이 일어나는 반응에서 강하게 발현되었고, 세포사멸이나 HR이 일어나지 않은 *X. c. pv. glycines* 8ra를 접종한 처리구에서도 초기 시간대에 다소 강하게 발현되었다가 감소되는 것으로 나타났다.

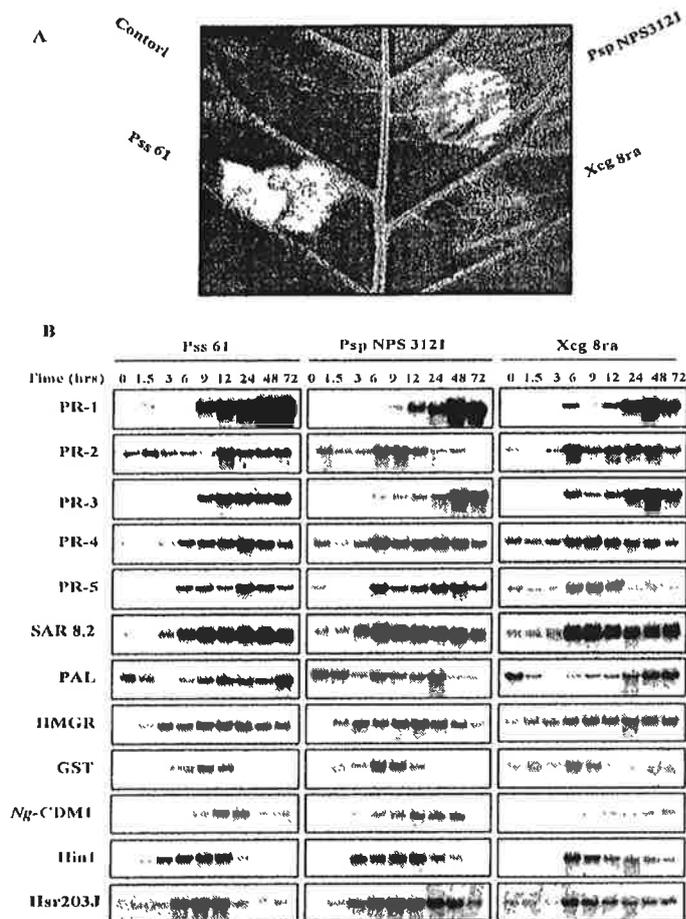


Figure 23. HR-cell death and expression of defense-related genes by nonhost-pathogen interaction.

(A) HR-cell death of tobacco plant leaves at 20 hr after infiltration with HR-inducing or non HR-inducing bacteria. These bacteria infiltrated with concentration of $>5 \times 10^7$ CFU/ml in distilled water. Control was infiltrated with water, Pss 61, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61; Psp NPS3121, *P. s.* pv. *phaseolicola* NPS3121; Xcg 8ra, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra.

(B) Time course expression of defense-related genes during cell death of tobacco plant by nonpathogens (HR-inducing bacteria; *P. s.* pv. *syringae* 61 and *P. s.* pv. *phaseolicola* NPS3121), and nonHR-inducing bacteria; *X. c.* pv. *glycines* 8ra) inoculation. Tobacco plants were inoculated with these bacteria (5×10^7 CFU/ml) in distilled water, pH 6.8, by fully injected with needless in leaves. Twenty μ g of total RNA samples were blotted on nytran membrane and hybridized with 32 P-labeled cDNA probes indicated in the figure.

나. 병원체의 침입시 세포사멸과 관련한 #630 promoter :: GUS fusion expression system을 이용한 형질전환 식물의 활용

1. 연구 내용 및 결과

1) 실험재료 및 방법

가) 식물 재료 : #630-프로모터 분석을 위해 형질전환 식물을 만들기 위해 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc를 이용하였으며, 식물배양실(26 ± 2°C, 16시간 광/8시간 암조건)에서 식물을 성장시킨 후 사용하였다.

나) #630-프로모터 클로닝 : #630 유전자가 TMV에 감염된 담배 잎에서 과민성 반응(hypersensitive response:HR)이 일어나는 동안에 특이적으로 발현되기 때문에 이 유전자의 작동 메커니즘을 연구하고자 하는 목적으로, 프로모터 부분을 *N. glutinosa*의 genomic DNA로부터 클로닝 하기 위하여 이 유전자의 cDNA library screening을 통해 얻은 open reading frame(ORF)의 제한효소 지도를 바탕으로 I-PCR을 수행하였다. *N. glutinosa*의 genomic DNA를 제한효소로 절단 후, self-ligation시키고 ORF 서열을 근거로 제작된 프라이머(forward primer : 5'-GGCTCTCATTTTTCCAAAAGTTTGAAA AGCAAAAC-3'와 reverse primer : 5'-GTATGCTATATGGGAAGAGAAAAGTCAAAAC ATTG-3')를 이용하여 반응하였으며, PCR 산물을 pGEM-T easy vector(Promega)에 클로닝하여 *E. coli*에 형질전환 후 얻어진 프로모터 부분의 염기서열을 분석하였다.

다) #630-프로모터의 deletion construct의 제조 : I-PCR을 통해 얻은 #630-프로모터 부분을 염기서열에 근거하여 각각 다르게 합성된 7 가지의 forward 및 reverse primer는 다음과 같이 제작하였다.

㉞ Forward primer

- F3 : 5'-ACG AAG TTA CAT ACA GAA TAT ACT AGC-3',
- F4 : 5'-ACG AAG CTT TAG TAT ATA TCC GAA CAA G-3',
- F5 : 5'-ACG AAG CTT TTT CAT CAT CAT GTG GTA C-3',
- F6 : 5'-ACG AAG CTT ATA GCG TAC TAG TAA TAG C-3',
- F7 : 5'-ACG AAG CTT TAA GCA CAA CAG ATT ATT G-3',
- F8 : 5'-ACG AAG CTT ATA AGG AAT TCA AAA CAC G-3',
- F9 : 5'-ACG AAG CTT AAA AGC AAA ACT CAA AAC G-3'

㉔ Reverse primer

R4 : 5'-CGA GGA TCC TTA AGG CTA TGG TTA ATA C-3'

를 이용하여 7 가지의 #630-프로모터 deletion construct들을 PCR 방법으로 얻었으며 형질전환 벡터를 만들기 위하여, 합성된 프라이머는 5'-말단과 3'-말단 부분에 각각 제한효소, *HindIII*와 *BamHI*의 인식부위가 있는 degenerated 프라이머로 디자인하였다.

라) 형질전환 벡터의 제조 : #630-프로모터에서 이 유전자의 작동에 직접적으로 관여하는 프로모터상의 염기서열을 분석하기 위하여, pBI101 벡터를 기본으로 하여 PCR로부터 얻어진 #630-프로모터 deletion construct들과 형질전환 벡터를 제작하였다. 프로모터의 각 deletion construct들을 pBI101 벡터(reporter 유전자인 GUS 앞에 프로모터 부분이 없음)의 GUS 유전자 앞에 *HindIII*와 *BamHI* 사이에 각각 클로닝하였다.

마) 형질전환 담배의 제조 : 형질전환 벡터 상에 있는 GUS 유전자의 발현정도를 통해 TMV 감염시 #630-프로모터 부분에서 #630 유전자의 발현에 스위치로 작용하는 염기서열을 찾기 위해, 우선 각각의 형질전환 벡터를 *Agrobacterium* LBA4404 균주에 형질전환 시켰다. 대조구로 동일한 조건에서 동일한 균주에 pBI101(negative control)과 pBI121(GUS reporter 유전자 앞에 CaMV 35S 프로모터를 가지고 있음 : positive control) 벡터를 각각 형질전환시켰다. pBI101과 pBI121 벡터는 모두 식물의 형질전환체 선별에 사용되는 kanamycin(Km) 저항성 유전자(*nptII*)를 가지고 있기 때문에 형질전환된 *Agrobacterium* LBA4404를 Km이 포함된 배지에서 선별하여 준비된 담배 잎과 공동 배양하였다. 현재 형질전환 벡터와 대조구 벡터로 형질전환된 *Agrobacterium*과 공동 배양된 담배 잎은 Km이 포함된 선별 배지에서 재분화 중에 있다.

2. 연구 결과

가) #630-프로모터의 클로닝

담배에서 TMV 접종시 과민성 반응(HR)에 따른 세포사 과전에서 특이적으로 발현되는 #630 유전자의 프로모터를 클로닝하기 위하여 PCR을 수행하였다. Fig.1에서 보는 바와 같이 *N. glutinisa*의 genomic DNA를 *NdeI*, *HindIII*, *ScaI*, 그리고 *XbaI*으로 절단한 후, self-ligation을 시킨 DNA를 주

형으로 PCR을 수행하여 대략 1.3kb 크기의 PCR 산물을 얻었다(Fig.24). 이 산물을 재 반응시켜 정확하게 PCR 산물이 얻어짐을 확인하였다(data not shown). 얻어진 PCR 산물은 T-vector에 클로닝하여 염기서열을 분석하고 이 클론을 프로모터 분석의 주형으로 사용하였다.

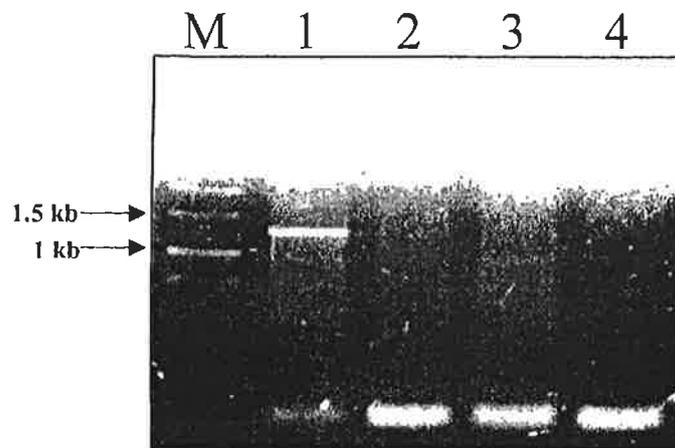


Fig 24. Inverse PCR of #630-promoter region using the self-ligated *N. glutinosa* genomic DNA digested by each restriction enzyme.
M : 1 kb DNA ladder(200ng), L1 : *Nde*I, L2 : *Hind*III,
L3 : *Sac*I, L4 : *Xba*I

나) #630-프로모터의 deletion construct

#630 유전자의 작동 메카니즘에 대하여 실험하고자 I-PCR을 통해 얻은 프로모터 클론을 주형으로 7 가지의 construct를 제조하였다[Fig. 25 and 25(A)]. 일차적으로 대략 500bp ~ 1015bp 사이는 703bp를 중심으로 2개의 construct를 만들고 500bp이하는 대략 100bp 크기의 construct로 디자인하였다. 그리고 PCR을 통하여 7 가지 construct의 산물[Fig.25 (B)와 (C)] 얻은 후, 다시 이들을 각각 T-vector에 클로닝하였다. 이 DNA 조각들은

5'-말단에 *Hind*III와 3'-말단에 *Bam*H I 인식부위를 가지고 있어 이들 효소로 절단 후, pBluescript KS 벡터에 다시 클로닝하여 삽입된 부분의 3'-말단 염기서열 분석을 통해 정확한 클론을 선별하였다(Fig. 26).

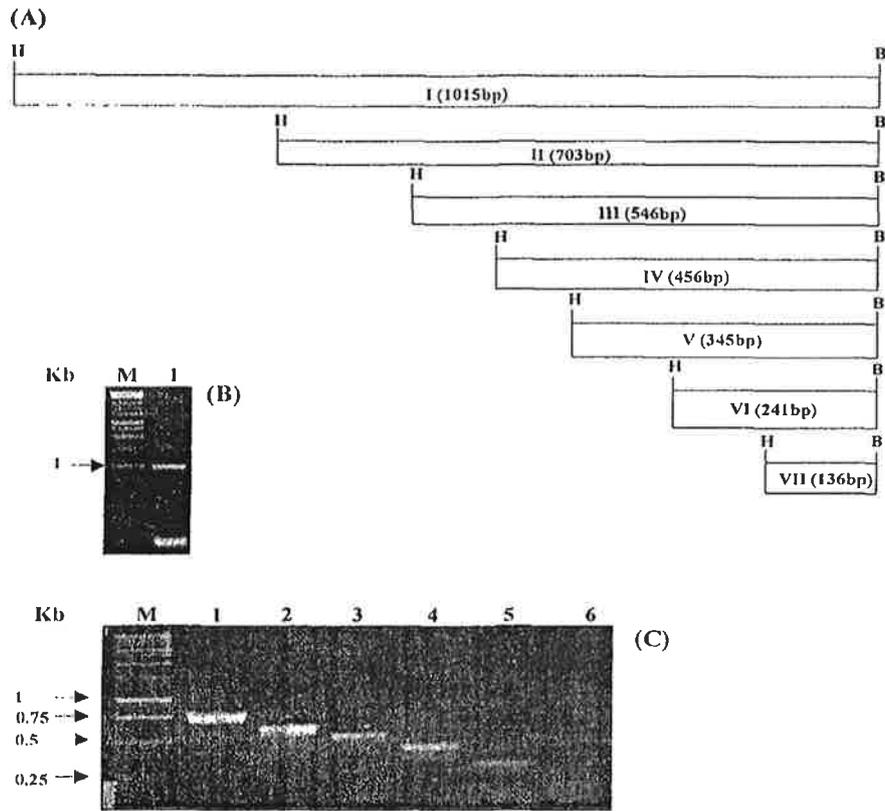


Fig. 25. #630-promoter deletion constructs and PCR products using forward primers, 630P-F3, F4, F5, F6, F7, F8, and F9 and reverse primer, 630P-R4.

(A) : Scheme of #630-promoter deletion constructs

(B) : L1:Fragment I

(C) : L1:FragmentII, L2:FragmentIII, L3:FragmentIV,

L4:FragmentV, L5:Fragment VI, L6:Fragment VII

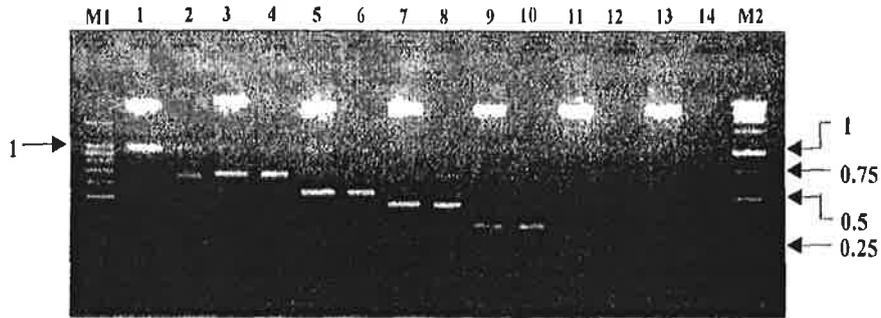


Fig. 26. Confirmation of #630-promoter deletion constructs before the transformation into *Agrobacterium* LBA4404.

M1 : 100bp DNA ladder, M2 : 1 kb DNA ladder

다) 형질전환 벡터의 제조

PCR, 클로닝, 그리고 염기서열 분석을 통해 확인된 #630-프로모터의 deletion construct들을 담배에 형질전환 시키기 위하여 식물의 유전자 발현 연구에 이용되는 vector인 pBI101 vector에 클로닝하였다. 각 construct의 양 말단을 각각 *Hind*III와 *Bam*H I으로 절단 후, pBI101 vector GUS 유전자 앞 프로모터 부분의 *Hind*III와 *Bam*H I 절단 부분에 클로닝하여 형질전환 벡터를 제조하였다[Fig. 27 and 27(A)]. 제조된 각 형질전환 벡터들은 각각 *E. coli* 형질전환체에서 분리하여 *Hind*III와 *Bam*H I으로 절단하여 확인하였다[Fig. 27(B)]. 확인된 형질전환 벡터들은 다시 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환 되었으며 positive control로 pBI101 vector와 negative control로 pBI121 vector를 또한 이 균주에 각각 형질전환시켰다. pBI101과 pBI121 모두 Km에 대한 저항성 유전자인 *npt*II를 가지고 있기 때문에 Km(25µg/ml)이 들어있는 배지에서 형질전환된 *Agrobacterium*을 선별하였다.

라) 형질전환 담배의 제조

각각의 #630-프로모터의 재조합 플라스미드 벡터로 형질전환된 *Agrobacterium*을 담배 잎과 공동 배양하였다. 담배는 *N. tabacum* cv. Xanthi nc를 사용하였으며 식물 배양실(26±2°C, 16시간 광, 8시간 암상태)에서 본엽이 3~4장 나온 어린 식물의 잎을 취해서 멸균된 2%

hyperchloride solution과 DDW로 표면 살균 후, 형질전환 1 균주 당 50개의 leaf disk를 만들어 MS 액체배지에서 공동배양(27h~72h)하고, Km(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 BAP(Shoot-inducing media: 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)들어있는 MS 고체배지에서 치상하여 재분화하였다. 재분화된 형질전환 식물의 뿌리를 유도하기 위해 MS 고체배지(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Km 포함)로 옮긴 후 완전한 형질 전환 식물체를 만들었다(그림. 28). 완전한 식물체로 자란 각 형질전환 식물을 화분으로 옮긴 후, 식물 배양실($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 16시간 광, 8시간 암상태)에서 순화시켰다. 얻어진 형질전환 식물들은 앞으로 tobacco mosaic virus(TMV)의 감염에 의한 과민성 반응(hypersensitive response:HR)이 나타나는 담배 잎에서의 GUS 염색과 GUS activity를 분석함으로써 #630-프로모터의 작동에 중요한 부분을 찾고, 이를 통한 이 프로모터의 특성 분석을 계속 수행 중에 있다.

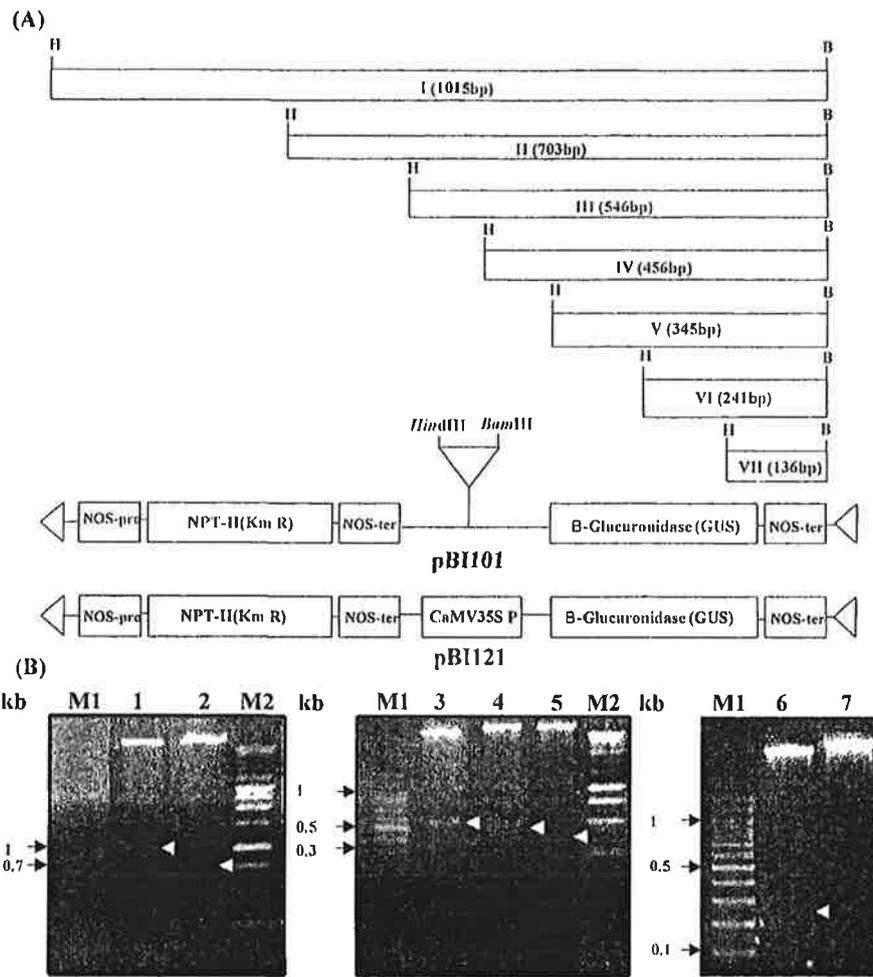


Fig.27. Construction of plant expression vectors for construction of transgenic tobacco plant. (A) Construction of plant expression vectors, pBI101(negative control) and pBI121(positive control). (B) Confirmation of transformed vectors. In each lane, fragments were digested with *Hind*III and *Bam*HI and then, constructs were transfected into *Agrobacterium* LBA4404 strains.
M1 : 100bp DNA ladder, M2 : 1 kb DNA ladder

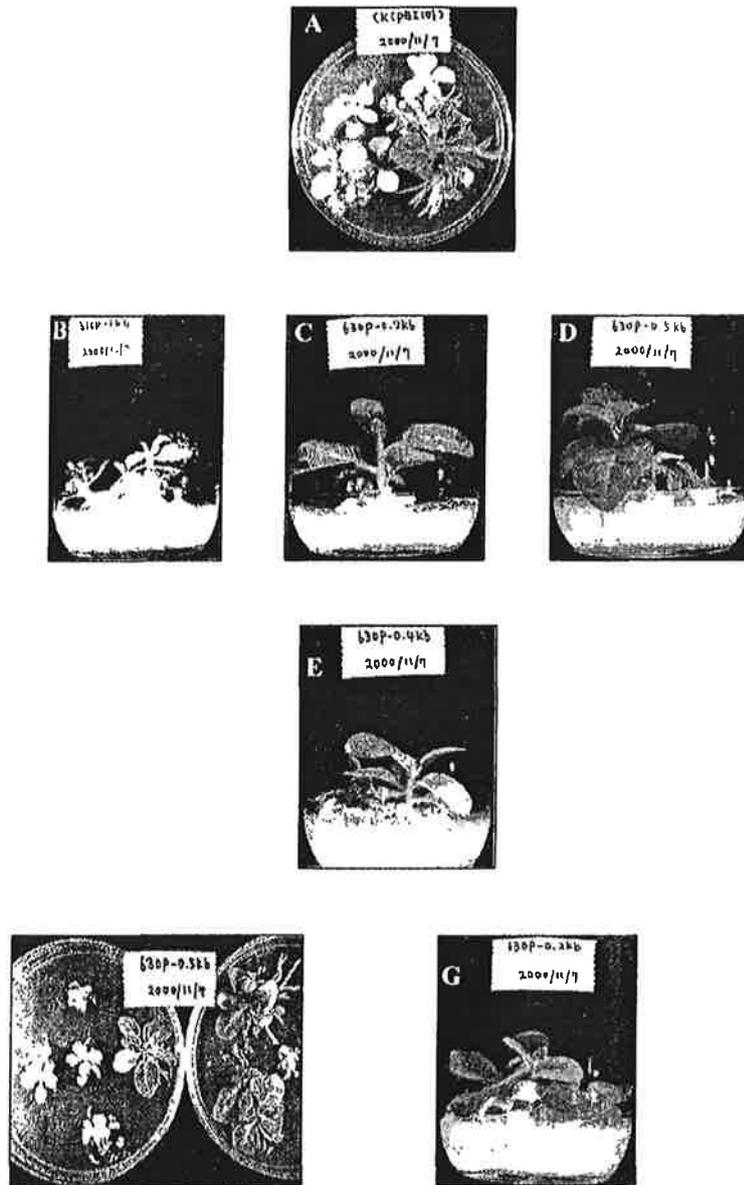


Fig.28. Transgenic tobacco plants. Each line is transformed to the pBI101 vector DNA(A) or the promoter-deletion construct of #630 gene, each(B - H); A:pBI101 only(control), B:1 kb, C:0.7 kb, D:0.5 kb, E:0.4 kb, F:0.3 kb, G:0.2 kb, H:0.1 kb. Each promoter-deletion construct is cloned into the multi-cloning sites(*Hind*III/*Bam*HI) of pBI101 vector. Selection media contain kanamycin(50ug/ml).

참 고 문 헌

- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudt, J., Leung, J., and Staskawicz, B. J. (1994). *Science* 265:1856-1860.
- Bolwell, G. P., Bell, J. N., Cramer, C. L., Schuch, W., Lamb, C. J., and Dixon, R. A. (1985). *Eur. J. Biochem.* 149:411-419.
- Bostock, R. M., Kuc, J. A., and Laine, R. A. (1982). *Science* 212:67-69.
- Brederode, F. T., Linthorst, H. J. M., and Bol, J. F. (1991). *Plant Mol. Biol.* 17:1117-1125.
- Casacuberta, J. M., Puigdomenech, P., and Segundo, B. S. (1991). *Plant Mol. Biol.* 16:527-536.
- Chappell, J., and Hahlbrock, C. (1984). *Nature* 311:76-78.
- Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D. F. (1993). *Science* 262:1883-1886.
- Choi, D., Ward, B. L., and Bostock, R. M. (1992). *The Plant Cell* 4:1333-1344
- Choi, D., Bostock, R. M., Avdiushko, S., and Hildbrand, D. F. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2329-2333.
- Choi, D., and Bostock, R. M. (1994). *Plant Physiol.* 104:1237-1244.
- Chung, I., Bown, A. W., and Shelp, B. J. (1992). *Plant Physiol.* 99:659-664.
- Clark, C. A. (1994). *Biological Control* 4:59-66.
- Cohen, Y., Gisi, U., and Niderman, T. (1993). *Phytopathology* 83:1054-1062.
- Cohen, Y., Niderman, T., Mosinger, E., and Fluhr, R. (1994). *Plant Physiol.* 104:59-66.
- Cohen, Y. (1994). *Phytopathology* 84:55-59.
- Crawford, L. A., Bown, A. W., Breitkreuz, K. E., and Guinel, F. C. (1994). *Plant Physiol.* 104:865-871.
- Dinesh-Kumar, S. P., Whitham, S., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4175-4180.
- Enyedi, A. J., Yalpani, N., Silverman, P., and Raskin, I. (1992). *Cell* 70:879-886.
- Fleming, T. M., McCarthy, D. A., White, R. F., Antoniw, J. F., and Mikkelsen, J. D. (1991). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:147-160.
- Friedrich, L., Moyer, M., Ward, E., and Ryals, J. (1991). *Mol. Gen. Genet.* 230:113-119.

- Gaffney, T., Fredrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessman, H., and Ryals, J. (1993). *Science* 261:754-756.
- Ghaouth, A.E., Arul, J., Grenier, J., Benhamou, N., Asselin, A., and Belanger, R. (1994). *Phytopathology* 84:313-320.
- Haberreder, H., Schroder, G., Ebel, J. (1989). *Planta* 177:58-65.
- Hain, R., Reif, H.-J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stoker, R.H., and Stenzel, K. (1993). *Nature* 361:153-156.
- Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1989). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:347-369.
- Harker, C.L., Ellis, T.H.N., and Coen, E.S. (1990). *The Plant Cell* 2:185-194.
- Hehl, R. and Baker, B. (1989). *Mol. Gen. Genet.* 217:53-59.
- Ho, J.-Y., Weide, R., Ma, H.M., Van Wordragen, M.F., Lambert, K.N., Koornneef, M., Zabel, P., and Williamson, V.M. (1992). *The Plant Journal.* 2:971-982.
- Holmes, F.O. (1938). *Phytopathology.* 28:553-561.
- Innes, R.W., Bisgrove, S.R., Smith, N.M., Bent, A.F., Staskawicz, B.J., and Liu, Y. (1993). *The Plant Journal.*
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J., and Jones, J.D.G. (1994). *Science* 266:789-793.
- Kunkel, B.N., Bent, A.F., Dahlbeck, D., Innes, R.W., and Staskawicz, B.J. (1993). *The Plant Cell* 5:865-875.
- Malamy, J., and Klessig, D. (1992). *The Plant Journal* 2:643-654.
- Martin, G.B., Carmen de Vicente, M., and Tanksley, S.D. (1993). *MPMI.* 6:26-34.
- Martin, G.B., Bromonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spey, R., Wu, T., Earle, E.D., and Tanksley, S.D. (1993). *Science* 262:1432-1436.
- Maurhofer, M., Hase, P., Meuwly, P., Metraux, J.-P., and Defago, G. (1994). *Phytopathology* 84:139-146.
- Mindrinos, M., Katagiri, F., Yu, G.-L., and Ausubel, F.M. (1994). *Cell* 78:1089-1099.
- Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H. (1990). *Plant Mol. Biol.* 15:941-946.
- Parker, J.E., Szabo, V., Staskawicz, B.J., Lister, C., Dean, C., Daniels, M.J., and Jones, J.D.G. (1993). *The Plant Journal.* 4:821-831.

- Pfützner, U.M., and Goodman, H.W. (1987). *Nuc. Acid Res.* 15:4449-4465.
- Pfützner, A. J. P., Beilman, A., Goodman, H.M., and Pfützner, U.M. (1991). *Plant Mol. Biol.* 16:129-139.
- Rasmussen, J. B., Hammerschmidt, R., and Zook, M.N. (1991). *Plant Physiol.* 97:1342-1347.
- Regrand, M. (1983). *Biochemical Plant Pathology* pp367-385.
- Ryals, J., Uknes, S., and Ward, E. (1994). *Plant Physiol.* 104:1109-1112.
- Ryder, T. B., Cramer, C. L., Bell, J. N., Robbins, M. P., Dixon, R. A., and Lamb, C. J. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:5724-5728.
- Ryder, T. B., Hedrick, S. A., Bell, J. N., Liang, X., Clouse, S. D., and Lamb, C. J. (1987). *Mol. Gen. Genet.* 210:219-233.
- Scholthof, K. -B., Scholthof, H. B., and Jackson, A. O. (1993). *Plant Physiol.* 102:7-12.
- Schuch, W. (1989). *Plant Mol. Biol.* 12:367-383.
- Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G., and Jones, J. D. G. (1995). *Science* 268:661-667.
- Strittmatter, G., and Wegener, D. (1993). *Z. Naturforsch* 48:673-688.
- Tanksley, S. D. (1992). *Mol. Gen. Genet.* 236:113-120.
- Conrath, U., Chen, Z., Ricolglano, J. R., and Klessig, D. F. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7143-7147.
- Vogeli, U., and Chappell, J. (1988). *Plant Physiology* 88:1291-1296.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D., Ahl-Goy, P., Metraux, J. -P., and Ryals, J. A. (1991). *The Plant Cell* 3:1085-1094.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. (1994). *Cell* 78:1101-1115.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M. A., Kleier, D. A., and Raskin, I. (1991). *The Plant Cell* 3:809-818.

제 출 문

생명공학연구소장 귀하

본 보고서를 “유전공학기법을 이용한 병저항성 유도물질 탐색 및 식물보호제 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “식물 바이러스병 저항성 유도물질 개발에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 11. 15.

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 김 영 호

연 구 원 : 전 용 호

연 구 원 : 전 옥 경

연 구 원 : 성 미 주

협동연구기관명 : 인삼연초연구원

협동연구책임자 : 김 갑 식

연 구 원 : 박 은 경

연 구 원 : 여 운 형

연 구 원 : 채 순 용

연 구 원 : 김 영 숙

여 백

요 약 문

I. 제 목

바이러스병 저항성 유도물질 탐색

II. 연구개발의 목적 및 중요성

III. 연구개발 내용 및 범위

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

- 곰팡이, 세균 등의 미생물 자원으로부터 식물바이러스 저항성 유도물질 또는 방어물질을 개발하기 위해 TMV에 저항성으로 국부병반을 형성하는 담배 품종 (Xanthi-nc NN)을 이용한 screening system을 사용하여 조사하였다.
- 전체 미생물 285 균주 중 15균주의 배양액으로부터 높은 항바이러스 활성이 있음을 확인하여 조사 균수의 약 5%에 해당되는 빈도를 나타내었다.
- 항바이러스 활성을 보이는 균주 중 활성이 높고 활성물질이 비교적 안정하다고 판단되는 균주에 대해서는 대량배양하여 물질 정제를 시도한 결과, 대부분의 항바이러스 물질이 비교적 친수성인 특성을 나타내었다.
- 곰팡이의 경우 액체배지보다 쌀배지인 고체배지에서 물질의 생산이 많아지는 경향이었고, 특성이 다른 항바이러스 물질의 생산도 관찰되었다. 그러나 쌀배지에서는 1개월에서 2개월까지의 장기간의 배양기간이 요구되었다.
- 곰팡이로부터 항바이러스 물질의 개발은 물질 생산을 위한 곰팡이의 배양기간이 길고 또 생산량도 낮아 농용 바이러스제로 개발하기에는 그 실효성이 낮다고 생각된다.
- 두 가지 항바이러스 물질의 작용 mechanism으로 chryso-permin D는 virus의 infection을 차단하였고, 이 연구에서 새로이 밝혀진 scopoletin은 PR protein의 발현과 관련있는 저항성 유도 물질로 밝혀졌다. 그러나 이 두물질 모두 농용 항바이러스제로서는 경제성과 작용면에서 실효성이 낮은 것으로 판단된다.
- 세균(*Pseudomonas putida* JB-1)으로부터 분리된 물질은 단백질성이어서

이 단백질을 이용한 유전자 cloning이 보다 용이하게 이루어질 수 있으며, 보다 우수한 균주 개발, 이 단백질 유전자의 형질전환 등에 이용될 수 있을 것이다. 또한 세균은 배양기간이 짧고, 액체배양액을 식물체에 직접 살포할 수 있으므로 농용 항바이러스제로도 유용할 것이다. 이 균주를 이용한 식물 바이러스 방제에 다각도의 이용이 검토가 필요하다.

SUMMARY

I. Title of the study

II. Objectives and importance of the study

III. Contents and scope of the study

IV. Results and their application

- Tobacco cultivar Xanthi-nc NN, a local lesion host resistant to TMV, was used as a test plant for the screening of antiviral agents from various microbial sources including fungi and bacteria.
- A total of 285 isolates were cultured and tested for the antiviral activity, and 15 isolates among them showed a strong TMV-inhibitory activity, which comprise about 5% of the total.
- Out of the antiviral isolates, 5 isolates which produced stable and pertinent antiviral materials in their cultures were selected and further studied for the isolation of the active materials. The antiviral materials produced by the isolates were relatively hydrophilic in nature.
- In the fungal isolates, the yield of antiviral materials seemed to be higher in solid media such as rice culture than liquid media. Other antiviral materials that not found in liquid cultures were also produced in the rice culture. However, it took longer time for the fermentation of the isolates in solid media, usually 1 to 2 months.

It seems to be little efficient to develop agroviricides from fungi

because of the long fermentation periods of time and low productivity of the active materials,

- Two antiviral materials, chrysofermin D and scopoletin which is newly determined for their activity in our study, were examined for the action mechanism. Chrysofermin D block the infection probably by inhibiting uncoating of the virus particles, and scopoletin acted as a resistance-inducing agent (inducing PR-1 gene expression). However, they both may have low feasibility as agroviricides because of low economic values and practical action modes.

- A bacterial isolate (*Pseudomonas putida* JB-1) produced heat-stable and proteaseous antiviral materials. The proteaseous materials may be used more easily for the cloning of their genes, which can be applied to develop more useful bacteria and for the development resistant plants by the gene transformation. Also it has a potential to be developed as a agroviricide because of the relatively short period of time for its culturing and its easy application using the bacterial culture per se in practice.

CONTENTS
(영 문 목 차)

- Chapter 4. Development of natural protectants against plant viruses
1. Introduction
 2. Materials and Methods
 3. Results and Discussion
 4. Conclusion
 5. References

여 백

제 3 장 식물 바이러스병 저항성 유도물질개발

제 1 절 서 설

담배, 고추, 토마토 등 우리나라 농가의 주요 특용 및 원예작물은 각종 병해충에 의해 해마다 피해를 입고 있다. 특히 바이러스병에 의한 피해는 이들 원예작물에 있어서 큰 비중을 차지하고 있다. 예를 들어 담배의 경우 황색종 산지에서 가장 문제가 되고 있는 병해는 담배 모자이크바이러스 (TMV)로 평균 발병주율이 7.3 %이며 감염주는 30-40 %의 수량손실과 약 50 %의 대금손실이 초래되고 있다. 또한 고추와 토마토의 경우도 TMV, 감자바이러스 Y (PVY) 등 바이러스 병해가 큰 비중을 차지하고 있으며, 특히 TMV에 의한 피해는 고추를 재배하는 어느 지역에서나 발견할 수 있는 중요한 병해의 하나이다.

바이러스병을 방제할 수 있는 농약이 아직 개발되어 있지 않기 때문에 바이러스병의 방제는 주로 경종적인 방법이나 저항성 품종의 사용에 의존하고 있다. 최근에는 바이러스의 피복유전자나 복제유전자를 식물체에 도입하는 유전공학 기법을 이용한 저항성 품종 육성이 국내에서도 집중적으로 연구되고 있다.

전염원의 제거가 위주인 경종적인 방제방법은 대개의 경우 노동력이나 기계적인 힘을 필요로 하거나, 윤작이나 휴한지로 방치할 수 있는 여유분의 토지가 있어야 그 방제 효율성을 극대화할 수 있다. 그러나 우리나라의 경우 소규모 집약적인 농업구조를 갖추고 있으며 근래에 농업인구가 감소되고 인건비가 상승하여 경종적 방제 수단의 보급율이 저하하였고, 앞으로 더욱 이러한 문제가 심화될 전망이다. 또한 저항성 품종은 바이러스에 대한 저항성 뿐만 아니라 다른 병해충에 대한 저항성, 수량성과 품질 등 다른 여러 가지 특성이 고려되어야 하기 때문에 저항성 특성 하나만으로는 전면적인 보급이 어렵다. 특히 바이러스의 유전자를 이용한 저항성 품종의 육성은 이를 보급할 시에 따르는 유전적 생태적인 문제점이 명확히 해결되지 않은 상태에서 저항성 품종이 실용화되더라도 당분간은 제한적일

수밖에 없다.

바이러스 감염 억제 물질은 식물이나 미생물(특히 담자균)을 대상으로 1920년대부터 연구되어 왔으나, 식물 바이러스의 감염억제 물질 또는 바이러스 감염 억제 물질에 대해서는 아직 세계적으로 연구가 미진한 실정이다. 또한 지금까지 밝혀진 바이러스 감염 억제 물질은 대부분이 다당체나 단백질로 식물체에 침투 이행이 되지 않아 식물 바이러스 방제의 적용에는 한계가 있다. 따라서 농약처럼 바이러스 방제에 직접 사용할 수 있기 위해서는 침투 이행성이거나 식물체에 저항성을 유도할 수 있는 바이러스 감염 억제 물질의 개발이 필요하다. 이러한 물질은 작용 메카니즘과 관련하여 식물의 생리적, 유전학적인 연구로 분자생물학적인 바이러스 방제 방법의 적용범위를 일층 확대할 수 있을 것이다.

지금까지의 연구를 보면 식물 바이러스에 대한 바이러스 감염 억제 물질의 조사는 주로 미생물을 대상으로 실시되었다. 1950년대 이전 연구에서는 몇 종의 세균과 곰팡이가 바이러스 감염을 억제하였다는 보고(Mulvanian, 1926; Johnson & Hoggan, 1937)가 있고, 1950년 Gupta & Price는 49 종의 곰팡이 배양액을 screening한 결과 *Polyporus arcularius*가 southern bean mosaic virus의 감염을 88% 억제하였다는 보고가 있다. 또한 1952년 Bawden & Freeman은 담자균으로부터 바이러스 감염을 저해하는 polysaccharides를 발견하였고 1984년 Shimomura 등은 표고버섯으로부터 바이러스 감염 억제 물질인 peptide glucan을 분리하였다. 특히 표고버섯은 인축의 항바이러스에 대한 연구가 많이 수행되었다. 1993년 Aoki 등은 125 균주의 담자균 배양액의 항바이러스 활성을 조사한 결과 바이러스 감염저해 물질(polysaccharide)를 분리하였다. 한국인삼연초연구원에서는 바이러스 감염 억제 물질을 screening한 결과 여러 가지 담자균과 방선균 균주가 TMV의 감염을 효과적으로 억제하였다.

많은 고등식물이 식물바이러스의 감염을 억제하는 물질이 함유하고 있다(Goa, 1953). 그러나 이들 중 일부 물질만이 분리되었고, 이들 물질의 작용 기작에 관한 연구는 극히 일부에 지나지 않는다. 대표적인 식물체로는 자리공, 비름, *Chenopodium*속의 식물체 및 시금치 등인데, 그 중 자리공에 대해 연구가 가장 많이 이루어졌으며, 바이러스 감염 억제 물질은 protein(PAP)로 현재 국내외적으로 항바이러스 활성과 관련하여 분자생물

학적인 접근이 이루어지고 있다.

식물의 저항성과 관련하여 바이러스의 감염 억제효과가 있는 것으로 알려진 물질로 대표적인 것은 salicylic acid와 그 유도체로 이들 물질의 작용 기작이 집중적으로 연구되었다. Salicylic acid는 바이러스에 저항성 품종에서 바이러스 감염시 lesion의 크기를 감소시키며, 바이러스의 밀도를 억제하고, 저항성 반응과 관련된 단백질 (pathogenesis related protein, PR protein)을 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러나 Salicylic acid는 저항성을 유도하는 signal이 아니라 signal transduction에 필요한 물질로 알려졌다 (Vernooij 등, 1994).

본 연구에서는 식물, 곰팡이, 세균 및 방선균 자원으로부터 식물바이러스에 대한 항바이러스 물질을 screening하고 이들 물질의 분리 정제 및 분리된 물질 또는 기지 물질의 작용 메커니즘을 구명하여 항식물바이러스 물질의 개발과 이용성을 연구하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 미생물자원, 식물자원으로부터 바이러스 감염 억제 물질 탐색

토양, 산지(山地), 이병 식물, 버섯 등 다양한 미생물 자원으로부터 곰팡이와 세균을 선택배지를 사용하여 분리하였다. 곰팡이의 경우는 acidified potato dextrose agar를 사용하였고 세균의 경우는 nutrient agar 배지를 사용하였다. 각각의 배지에서 자란 균총(colony)을 순수 분리하여 각각의 배지에 증식시켰다. 분리한 곰팡이 균주들은 각각 potato dextrose broth에서 25℃로 15 - 20일간 배양하였다. 배양 후 배양액에 동량의 ethyl acetate를 주입하여 흔들어 준 후 ethyl acetate로 분배되는 추출물을 농축하였고, 다시 증류수를 원래의 배지와 동량으로 첨가하여 배양액과 동등한 농도로 만들었다. 세균의 경우는 nutrient broth에서 30℃로 3-5일간 배양후 곰팡이와 마찬가지로 ethyl acetate로 물질을 추출하여 항바이러스 활성 조사에 사용하였다. 식물체나 버섯의 자실체 경우 건조한 재료를 methanol로 추출하여 농축후 물로 희석하여 1%의 추출용액을 사용하였다. 각각의 곰팡이, 세균 배양액의 ethyl acetate 추출물과 식물체의 methanol 추출물을 담배 식물체 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) 잎의 반엽에 처리하고 즉시 또는 처리 1일 후 잎의 표면에 TMV 즙액을 접종하였다. TMV 접종 3-4일 후 표면에 나타난 반점의 크기와 수를 무처리 반엽 및 무처리 식물의 반점과 비교하여 바이러스 감염 억제 또는 증식 정도를 비교하였다.

2. 물질의 분리, 정제 및 물질의 특성 조사

균 배양액의 항바이러스 활성이 90% 이상을 나타낸 곰팡이 또는 세균 균주는 일반적인 물질의 분리 과정에 따라 물질을 분리하였으며 각 단계별로 위에서 언급한 바와 같이 항바이러스 효과를 조사하여 활성물질을 추적하였다. 즉 곰팡이는 PD broth에서 15일간, 세균은 Nutrient broth에서 3-4일간, 방선균은 C₄ 배지를 사용하여 3-4일간 배양하였다. 각각 2-4 L를 배양하였다. 배양 후 separation funnel을 사용하여 n-hexane - water 또는

n-Hexane - methanol로 분리하고, 물층이나 methanol층은 다시 chloroform - water로 물층은 다시 ethyl acetate - water, butanol - water로 분리하였다. 각각의 용매 분획은 농축하여 소량의 acetone이나 ethanol에 녹여 (5%) 원래의 농도보다 약 10배 정도로 농축된 희석용액을 Xanthi-nc 앞에 처리한 후 TMV를 접종하여 TMV의 감염억제 효과를 조사하였다. 이들 중 용매 추출과정에서 지속적으로 높은 활성을 보이고 균주 배양 추출물은 Diaion HP-20의 흡착력, silica gel column chromatography, TLC 등을 이용하여 물질을 부분 정제하였다. 또한 물질의 열 안정성 등 몇 가지 물질의 특성을 조사하였다.

3. 바이러스 감염 억제 mechanism 조사

또한 새로운 바이러스 감염억제 및 저항성 유도물질의 창출에 기초적인 정보 제공을 위하여 항바이러스 물질에 대한 작용 mechanism을 조사하였다. 이 연구에서 새로이 항바이러스 활성 또는 바이러스에 대한 저항성 유도물질로 확인된 물질과 기지의 물질이나 아직 활성 기작이 알려지지 않은 물질을 대상으로 바이러스 방제 기작을 조사하였다. 즉 바이러스 방제 기작으로는 감염억제와 증식억제 효과가 알려져 있는데 이를 뒷받침하는 것으로 전염실험에서 국부병반의 수와 면적을 비교하였고, 전자현미경적인 방법, 저항성 유도와 관련하여 pathogenesis-related protein gene의 발현 등을 조사하였다. 전자현미경 및 PR protein gene 발현의 조사방법은 통상적인 방법에 준하였다.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 균류 및 야생식물 자원 수집 및 항바이러스 활성 조사

1996 - 1997년에는 균류(버섯 및 목재부후균)는 속리산, 한라산, 계룡산 등에서 총 256 점을 수집하였으며 이를 PDA 배지에서 분리한 결과 121 균주를 순수 분리하였으며 그 중 101 균주 배양액의 항바이러스 활성을 조사하였다. 대부분의 균주가 상온에서 생육이 양호하였다. 이 중 2 균주는 PD broth 배양기 내에서 자실체 형성이 관찰되었다. 또한 야생식물은 궁궁이줄기, 흰물봉선 등 식물체 10 가지와 달맞이꽃, 맥문동 등 식물종자 31가지의 methanol 추출물을 조사하였다. 분리한 곰팡이 배양액과 식물재료 추출물의 TMV에 대한 항바이러스 활성을 표 1에서 나타난 것과 같이 곰팡이 균주 101 균주중 비교적 강한 항바이러스 활성이 나타난 균주가 모두 4 균주였다. 항바이러스 활성이 강한 4 균주중 2 균주에서만 처리한 담배 잎에서 국부병반의 크기가 감소되는 경향을 보여 바이러스 증식억제 가능성이 있는 것으로 생각되었다. 그러나 식물 추출물은 항바이러스 활성이 없거나 매우 낮은 것으로 나타났다.

1997-1998년도에도 山地에서 버섯, 수목의 이병 부위에서 사상균 채집하여 82종을 순수 분리하였으며 이들을 PDA에 배양하여 배양액의 항바이러스 활성을 조사한 결과 TCP-1 (90% 항바이러스 효과)과 PRH-3 (98% 항바이러스 효과)의 우수 균주를 선발하였다. 또한 1998-1999 년도에는 곰팡이 57 균주를 주로 담배 포장의 토양으로부터 분리하고 이들의 배양액과 균체 추출물로부터 바이러스 감염 억제 활성을 조사한 결과 3 균주가 90% 이상의 감염 억제 활성을 보였다. (표 2). 특히 GTRIF-13 균주는 배양여액 원액과 TMV 희석액(600배)을 혼합처리시 국부병반 형성이 관찰되지 않았으며 GTRIF-13 균주 배양액을 처리한 담배잎의 국부병반은 대조구에 비하여 병반 크기가 감소하여 감염억제 효과와 함께 증식억제 효과가 있는 것으로 추정되었다. 또한 GTRIF-43은 배양여액에서만 바이러스 감염 억제 효과가 관찰되었다.

1999-2000년도에는 사상균 30점 세균 30점의 항균활성을 조사하였으며 그 중 곰팡이 1종, 및 세균 2 종이 비교적 높은 항바이러스 활성을 보임.

표 1. 곰팡이 균주 배양액 및 식물재료 조추출물의 항바이러스 효과 조사

분리연도 (균주수)	균주명	감염 억제 효과 (%) [*]	증식 억제 효과 ^{**}
1997 (101)	CKN-6	85.7	±
	JEH-1	76.5	-
	CSR-70	83.4	-
1998 (82)	SRH-12	80.1	±
	TCP-1	90.0	-
	PRH-3	98.0	-
1999 (57)	GTRIF-13	100.0	+
	GTRIF-43	90.0	-
	GTRIFan-1	93.0	-
2000 (45)	PL-10	83.3	-
	JB-1	93.3	+
	JB-2	79.2	-
전체 (285)	15 균주		

- 식물재료 41종에서는 항바이러스 효과가 나타나지 않음.

* 국부병반수에 의한 비교

** 국부병반 면적에 의한 비교 (+: 효과 있음, ±: 효과 불확실, -: 효과 없음)

이상의 결과를 종합하여 볼 때 식물보다는 미생물에서 TMV 감염억제 효과를 가진 물질의 빈도가 월등 높았다. 많은 균주를 screening 한 것은 아니지만 전체 285 균주 중 약 5%에 해당되는 15균주가 높은 항바이러스 활성을 나타내었다.

2. 항바이러스 물질의 특성 조사

위에서 조사된 균주중 항바이러스 활성이 강하고 물질 분리 도중에 지속적으로 활성을 유지한 균주와 바이러스 증식 억제 효과 (유도저항성 효과)가 있는 균주들을 대량배양하여 항바이러스 물질을 분리하고 그 효과를 조

사하였다.

가. CKN-6 - 미동정 곰팡이

CKN-6 균주는 실온에서 생장이 거의 이루어지지 않아 PD broth 배지에서 45일 이상 지속하였을 때 균사의 부분적인 성장만이 이루어졌고 고체배지 (PDA 및 쌀배지)에서는 생육이 극히 불량하거나 전혀 성장하지 못하였다. 그러나 20℃에서는 군사생장이 빨라지고 고체배지에서도 생육이 가능하였다. 이 균주의 대량배양에는 약 2개월이 소요되었다.

CKN-6은 군사체에서는 항바이러스 활성이 없었으며 배양액에서만 항바이러스 활성이 관찰되었다 (표 2). 배양액을 유기용매에 대한 분배성으로 물질 분리를 시도한 결과 ethyl acetate와 butanol에 분산되어 나타나 이 균주의 항바이러스 활성물질은 전반적으로 용해성이 낮은 물질로 판단된다. 이는 silica gel chromatography에 의한 결과에서도 같은 양상을 보이고 있는데 (표 3), 이 균주의 항바이러스 물질을 분리하기 위해서는 이와는 다른 분리 방법을 사용해야 할 것으로 생각된다.

표 2. CKN-6의 분배 용매별 항바이러스 활성 조사

분획	감염 억제 효과 (%) [*]	증식 억제 효과 ^{**}
Ethyl acetate	95.5	±
Butanol	75.7	—
Water	±	—
Mycelial extract	—	—

*, ** 국부병반 수, 면적에 의한 비교 (±: 효과 불확실, —: 효과 없음)

표 3. Ethyl acetate 분획의 silica gel column chromatography에 의한 항바이러스 활성

분리용매 (CHCl ₃ : Methanol)	감염 억제 효과 (%) [*]	증식 억제 효과 ^{**}
CHCl ₃	—	—
9:1	±	—
8:2	+	—
7:3	+	—
6:4	±	—
5:5	—	—

* ,** 국부병반수, 면적에 의한 비교 (+: 효과 있음, ±: 효과 불확실, -: 효과 없음)

CKN-6를 Diaion HP-20의 흡착성을 이용하여 물질 분리를 시도한 결과 흡착후 50% methanol로 용출한 추출물에서 강한 항바이러스 활성이 관찰되었으나, 이 흡착제를 통과한 배양액에서도 항바이러스 활성이 관찰되어 항바이러스 물질에 대한 Diaion HP-20의 흡착성이 크지 않는 것으로 생각되었다. 이에 대한 흡착성을 높이기 위하여 배양액에 NaCl를 1.6% 첨가하여 흡착시키고 물-methanol계로 용출한 결과는 표 4와 같다. 항바이러스 물질은 통과한 분액 (pass fraction)에서는 없는 것으로 나타나 흡착력이 높아진 것으로 생각된다. 활성물질은 흡착후 20% methanol로 대부분 용출되는 것으로 나타났다. 그러나 증식억제효과는 어느 분획에서도 관찰되지 않았다.

표 4. CKN-6의 Diaion HP-20에 흡착성을 이용한 항바이러스 활성 물질 분리

용출용매 (% methanol)	감염 억제 효과 (%) [*]	증식 억제 효과 ^{**}
Pass	—	—
20	99	—
40	68	—
60	—	—
100	—	—

* 국부병반수에 의한 비교. ** 국부병반 면적에 의한 비교 (—: 효과 없음)

나. SRH-12 - 담자균

SRH-12 균주는 PD broth 배지에서 장기간 배양시 자실체 형성이 관찰되어 버섯의 일종임을 알 수 있었다. 이 균주의 경우 배양 상태에 따라 활성의 변이가 심하게 나타나 물질의 생산이 불안정한 것으로 나타났다. 그러나 쌀배지를 이용하여 장기간 (1.5 - 2 개월) 배양하였을 때 지속적인 항바이러스 활성을 관찰할 수 있었다.

SRH-12의 쌀배양체를 용매 분배성을 이용하여 물질을 분리하고 이의 항바이러스 활성을 조사한 결과 배양체의 항바이러스 활성은 주로 ethyl acetate 분획에서 관찰되어 지용성 물질로 생각된다. Silica gel chromatography에서 용매 조성에서 ethyl acetate : methanol = 50:1에서 항바이러스 활성 물질이 분리되었다.

표 5. SRH-12의 분배 용매별 항바이러스 활성 조사

분획	감염 억제 효과 (%) [*]	증식 억제 효과 ^{**}
n-Hexane	-	-
Chloroform	-	-
Ethyl acetate	93.3	±
Water	55.0	-

* 국부병반수에 의한 비교 (-: 효과 없음)

** 국부병반 면적에 의한 비교 (±: 효과 불확실, -: 효과 없음)

표 6. SRH-12의 ethyl acetate 분획의 silica gel column chromatography에 의한 항바이러스 활성 물질 분리

분리용매 (ethyl acetate : methanol)	감염 억제 효과 (%) ^a	증식 억제 효과 ^{ab}
ethyl acetate	—	—
50:1	79.9	—
30:1	—	—
10:1	—	—
9:1	—	—
8:2	—	—
7:3	—	—
6:4	—	—
5:5	—	—

*, ** 국부병반수 면적에 의한 비교 (—: 효과 없음)

SHR-12 균주를 쌀배지에 대량 배양 (60 flasks)하여 그림 1의 물질 정제 과정을 통해 항바이러스 물질을 분리하였다. 물질 분리 결과 항바이러스 물질은 ethyl acetate layer와 butanol layer에 검출되었다. (crude ethyl acetate layer: 93.3 % 감염저지효과, crude butanol layer: 97.1 % 감염저지효과).

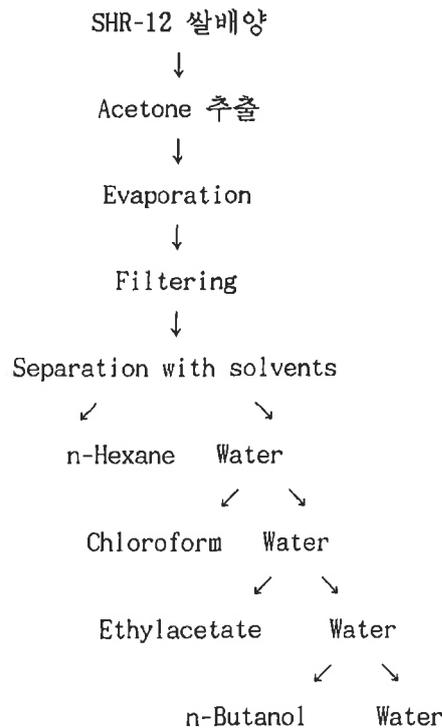


그림 1. SHR-12의 물질추출 과정

SHR-12의 ethyl acetate 분획을 open column chromatography한 결과 항 바이러스 물질은 ethyl acetate 1, 2, 3 분획에 있었으며 그중 ethyl acetate 2가 항바이러스 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 또한 위 세 분획을 합쳐 항바이러스 효과를 조사한 결과 100%의 감염저지효과를 나타내었으며, 위의 ethyl acetate-1, 2, 3은 역상 TLC에서 50% ethanol로 전개한 결과 5개의 fraction으로 분리되었다. TLC 상의 분획에서 methanol로 물질을 추출하여 감염억제효과를 조사한 결과 역상 TLC에서 Rf치가 높은 두 band에 바이러스 감염 억제 물질이 있는 것으로 나타났다. (표 7). 이 두 band는 ODS (water → 10% methanol → 30% methanol → 40% methanol → 50% methanol → 70% methanol → 90% methanol → 100% methanol 사용)로 물질을 분리한 결과 10%, 30% 및 40% methanol fraction에서 나타났고,

Chloroform - methanol (90:1→10:1→ 9:1 →7:1 → 5:1 → 3:1 → 2:1 → 1:1)로 open column 하여 물질을 분리한 결과 90:1과 10:1을 제외한 모든 fraction에서 TLC 상에 항바이러스 물질이 검출되었다. 이러한 결과로 볼 때 SHR-12의 ethyl acetate 분획의 항바이러스 물질은 분리가 매우 까다로운 물질로 생각된다.

표 7. SHR-12 ethylacetate 추출물의 TLC 분획별 TMV 감염 억제 효과

TLC 분획	감염 억제 효과 (%)	증식 억제 효과
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	89.5	-
5	71.4	-

TLC 전개용매 (역상, 50% ethanol). -: 효과 없음

SHR-12의 butanol 분획을 open column chromatography한 결과 항바이러스 물질은 chloroform : methanol = 9 : 1에서 분리되었다 (표 8). 또한 위 분획을 TLC (chloroform:methanol = 5:1로 전개)에서 band 별로 물질의 활성을 조사한 결과 TLC 상의 맨 아래 부분에 위치하였다 (표 9). 이러한 결과로 볼 때 SHR-12의 butanol extract에 포함되어 있는 항바이러스 물질은 친수성이 다소 강한 물질이라 사료된다.

표 8. SHR-12의 butanol 분획의 open column chromatography에 의한 분획별 TMV 감염저지효과

분리용매 (Chloroform : methanol)1	감염 억제 효과 (%) ^a
9 : 1 - 1st	-
9 : 1 - 2nd	98.2
9 : 1 - 3rd	-
8 : 2	-
7 : 3	-
6 : 4	-
5 : 5	-

표 9. SHR-12 butanol 추출물의 TLC 분획별 TMV 감염 억제 효과

TLC 분획 (chloroform: methanol = 5:1로 전개)	감염 억제 효과 (%) ^a
1	88.4
2	30.7
3	-
4	-
5	-

다. GTRIF-43 - 곰팡이

PD broth를 사용하여 곰팡이 GTRIF43 균주를 27°C, 220 rpm로 4일간 배양하였다. GTRIF43 균주가 생산하는 TMV 감염 억제 물질은 TMV와 혼합 또는 전처리시 모두 강한 감염 억제 활성을 보였으나 이면처리시 활성이 현저하게 약화되어 활성 물질의 침투이행 효과는 약한 것으로 나타났다 (표 10). 균체 추출물은 표 10과 마찬가지로 TMV 감염 억제 활성이 없는 것으로 나타났다.

표 10. GTRIF43 균주의 TMV 감염 억제 활성

분 획	TMV 감염 억제 활성(%)
배양 여액	
혼합처리	89.6
전처리	97.3
이면처리	43.3
균체 추출(70% EtOH)	0

GTRIF43 균주가 생산하는 감염 억제 물질은 ethyl acetate로 이행되었으며 hexane, butanol 등에는 이행되지 않았다. 따라서 배양액으로부터의 분리는 용매추출로 실시하였으며 활성분획은 TMV 감염 억제 효과를 조사하여 확인하였다. 즉 배양액 3배 volume의 ethyl acetate로 용매추출하고 감압농축 후 소량의 chloroform에 녹여 silica gel column chromatography를 실시하였음. 전개용매로 chloroform과 methanol 을 $\text{CHCl}_3 \rightarrow 95:5 \rightarrow 90:10 \sim 60:40$ 비율로 사용하였으며 활성물질은 95:5 용매계에서 대부분 용출되었음. 활성분획은 모아서 농축한 후 preparative TLC를 실시하였다. 전개용매는 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}(100:7)$ 을 사용하였으며 활성물질은 $R_f=0.43$ 에서 확인되었다. 활성물질의 최종 정제는 HPLC를 사용하여 실시하였다. 전개용매는 70% 함수 methanol을 사용하였고 column은 Capcell Pak(C18)을 사용하였으며 UV detector (300nm)로 활성물질을 검출하였다. 활성물질은 retention time 23분대에서 분리되었으며 반복 분취로 순수한 항바이러스 물질을 얻었다.

KGTRIF43 균주가 생산하는 항바이러스 활성물질은 병반형성 억제 효과와 함께 병반 크기 축소 효과도 나타내어 TMV 증식을 저해하는 것으로 추측되었다. 병반 축소 효과는 정제과정 중에 재현성 있게 관찰되었고 대조구에 비해서 70-80 %의 병반 크기 감소를 보였으며 혼합처리시 보다 전처리시 그 효과가 증가하였다.

정제된 활성물질의 생물활성: KGTRIF43 균주가 생산하는 항바이러스 활성물질의 항균활성을 조사하기 위해 정제된 활성물질을 ethanol에 녹인 후 paper disk당 50ug이 되도록 처리한 후 검정균에 처리하였다. 그 결과 그

람 양성, 음성 세균 및 효모, 곰팡이 등에 항균활성을 보이지 않았다.

라. PL-10 - 상황버섯

약용버섯으로 활용되고 있는 상황버섯(목질진흙버섯, *Phellinus linteus*) 균사체를 PD broth나 쌀배지에서 각각 27℃에서 20일 및 45일 배양하여 용매로 추출하여 항바이러스 활성을 조사하였다. 또한 용매 추출물의 항균활성을 조사하였는데 항균활성 조사는 paper disc에 배양 추출물을 흡즙시켜 건조시킨 후 *Bacillus subtilis* 균주를 plating한 petri-dish 중앙에 올려놓고 저지원의 크기를 조사하였다.

상황버섯의 균사체배양 추출물의 항바이러스 활성을 조사한 결과 액체 및 고체 배양 모두 water fraction이 강한 활성을 나타내었다. 특히 액체 배양의 water fraction은 거의 완벽하게 TMV의 감염을 차단하였다 (표 11). Water fraction에 존재하는 수용성 항바이러스 물질은 이미 보고된 *Phellinus linteus* polysaccharide(PLP)로 추정된다. 쌀배지에서는 water fraction뿐만 아니라 ethyl acetate fraction에서 항바이러스 활성 및 항균활성을 나타내었다.

표 11. 상황버섯 추출물의 항바이러스 및 항균 활성 조사

구분	PD broth culture			Rice culture	
	Ethyl acetate fraction	Water fraction	Chloroform fraction	Water fraction	
				Ethyl acetate fraction	Water fraction
병반수 감소(%)	0.0 ^a	98.9	0.0	74.0	85.6
병반크기 감소 (%)	-	-	-	-	-
항균활성	-	-	-	+	-

^a 3 반복 평균치, * 병반크기 감소, 항균활성 (+: 효과 있음, -: 효과 없음)

위에서 분리된 ethyl acetate fraction은 TLC (chloroform:methanol = 5:1)로 전개하였을 때 7 개의 주요 band로 분리할 수 있었으며, Rf치 낮은 band들, 특히 base에서 높은 항바이러스 활성과 항균활성이 나타나 이 물질 또한 위의 water fraction과 같거나 유사한 물질로 추정된다.

마. JB-1 - 세균

2000년도에는 지금까지와는 달리 세균의 항바이러스 활성을 조사하였다. 그 결과 두 균주가 높은 활성을 나타내었으며 그 중에서 JB-1의 활성이 매우 높아 이 세균이 생산하는 항바이러스 물질을 분리하고 그 특성을 조사하였다.

이 균주를 Biolog (표 12와 16S rDNA sequence를 이용하여 동정한 결과 *Pseudomonas putida*로 동정되었다.

이 균주의 액체 배양을 이용하여 항바이러스 물질을 추출한 결과, 항바

이러스 물질은 최종적으로 물층에서 가장 많았다. 즉 각각의 분배에서 chloroform-water에서는 water로, water 분획을 다시 ethyl acetate - water에서는 water로, butanol - water에서 또 water 분획으로 항바이러스 물질이 이행되어 이 균주가 생산하는 항바이러스 물질은 수용성 물질인 것으로 나타났다.

표 12. JB-1의 Biolog 분석 결과

water	α -cyclo dextrin	dextrin	glycogen	Inocen 20	Inocen 80	N-acetyl-D-galactosamine	N-acetyl-D-glucosamine	D-glucosamine	L-arabinose	D-arabitol	cellulose
L-erythritol	D-fructose	L-fucose	D-galactose	gentiobiose	α -D-glucobiose	m-inositol	α lactosamine	lactulose	maltose	D manitol	D-mannose
D-melibiose	β -methyl-D-glucoside	psicose	D-raffinose	L-rhamnose	D-sorbitol	sucrose	D-trehalose	turanose	xylitol	methypyruvate	mono-methylsuccinate
acetic acid	cis-asconitic acid	citric acid	formic acid	D-galactonic lactone	D-galacturonic acid	D-gluconic acid	D-glucosaminic acid	D-glucuronic acid	α -hydroxybutyric acid	β -hydroxybutyric acid	γ -hydroxybutyric acid
p-hydroxyphenylacetic acid	itaconic acid	α -ketobutyric acid	α -ketoglutaric acid	α ketoglutaric acid	D,L-lactic acid	malonic acid	propionic acid	quinic acid	D-saccharic acid	sebacic acid	succinic acid
bromosuccinic acid	succinonitrile acid	glucuronamide	alaninamide	D-alanine	L-alanine	L-alanylglutamic acid	L-asparagine	L-aspartic acid	L-glutamic acid	glycyl-L-aspartic acid	glycyl-L-glutamic acid
L-histidine	hydroxy-L-proline	L-leucine	L-ornithine	L-phenylalanine	L-proline	L-pyroglutamic acid	D-serine	L-serine	L-threonine	D,L-carnitine	γ -aminobutyric acid
urocanic acid	inosine	uridine	thymidine	phenylethylamine	putrescine	2 aminoethanol	2,3 butanediol	glycerol	D,D-glycerol phosphate	glucose-1-phosphate	glucose-6-phosphate

표 13. 용매의 분배성에 따른 JB-1 생산 물질의 항바이러스 효과

Chloroform-water	Control value(%)	Control value (%)
	Water	Chloroform
	94.0	6.6
Ethyl acetate - water	Control value(%)	Control value (%)
	Water	Ethyl acetate
	99.7	19.9
Butanol - water	Control value(%)	Control value (%)
	Water	n-Butanol
	99.3	26.2

* 2 x 1.5cm 의 TMV 병반수에 의해 무처리와 대비함 (9 반복).

JB-1의 배양기간에 따른 항바이러스 물질의 생산은 배양 4일 이후 증가하여 5일 재부터 높은 항바이러스 효과를 나타내었다 (표 14). 그러나 OD

값에 의한 세균의 밀도는 오히려 5일째에 감소하였다. 아마도 이 물질은 세균의 생육 후기에 많이 생성되든지 혹은 세포가 사멸함에 따라 세포내 물질이 배양액으로 유출되는 것이 아닌가 생각된다.

표 14. JB-1의 배양기간에 따른 항바이러스 활성의 변화

Incubation time (days)	O. D. ₆₀₀	Control value
	2	1.274
3	1.158	62.09
4	1.034	80.45
5	0.933	94.12
6	0.895	95.59

* 2 X 1.5cm 의 TMV 병반 수.

균주 배양액의 water fraction의 항바이러스 물질의 특성을 조사하기 위해 단백질 분해 효소를 처리한 결과 (표 15), 이 물질의 활성이 없어져 단백질성 물질로 생각된다. 또한 열에 대한 안정성을 조사한 결과 (표 16) autoclave 시에만 항바이러스 활성이 다소 감소하여 열에 무척 강한 물질이라 생각된다.

표 15. Protease K 처리에 의한 JB-1 compounds 의 anti-TMV 효과

Replica tion	Protease K + JB-1	Control		JB-1 only	Control	
		Control	Control value (%)		Control	Control value (%)
I	25*	30	16.67	1	35	97.14
	31	34	8.83	3	29	89.67
	26	28	7.14	1	30	96.67
II	40	38	0.00	0	38	100.00
	36	40	10.00	1	40	97.50
	24	26	7.69	1	29	96.56

*2 x 1.5cm 의 TMV 병반 수.

표 16. JB-1 생산 항바이러스 물질의 열에 대한 안정성 조사

Temperature	Treatment	Control	Control value (%)
60 °C	1	173	99.4
80 °C	1	158	99.3
boiling	1	173	99.4
Autoclaved	38	161	76.5
No treatment	0	168	100.0

*2 X 1.5cm 의 TMV 병반 수.

이 물질의 침투효과 및 유도저항성 효과를 보기 위해 잎의 뒷면에 물질을 처리하고 잎의 앞면에 TMV를 접종하여 병반의 형성율을 조사한 결과는 표 17에서 보는 바와 같이 50% 정도의 방제효과를 보였다. 잎의 앞면에 처리하였을 때 직접적인 효과보다는 낮은 효과를 나타내었으나 유의할 만한 결과로 생각된다.

표 17. JB-1 균주가 생산하는 항바이러스 물질의 침투 또는 저항성 유도 효과

Treatment		Control	Treatment		Control	Treatment		Control
뒷면	Control	value (%)	앞면	Control	value (%)	Check	Control	value (%)
18*	55	67.3	0	45	100.0	35	40	12.50
3	12	25.0	0	26	100.0	43	42	0.00
8	15	46.7	0	16	100.0	20	23	13.04
평균		46.3			100.0			8.5

* 2 x 1.5cm 의 TMV 병반 수.

JB-1이 생산하는 단백질성 물질은 열에 안정하기 때문에 앞으로 배양액을 직접 처리하거나 열을 가하여 균은 사멸시키고 배양액만을 처리할 때 생물학적 바이러스 방제제로 활용가치가 있을 것으로 생각된다. 또한 이러한 단백질성 물질의 cDNA를 cloning하여 보다 효율적인 균주 개발이나 식물의 분자 육종을 통해 저항성 품종을 개발함으로써 바이러스 방제에 활용할 가치가 있다고 하겠다.

3. 바이러스 감염 억제 물질의 작용 mechanism 조사

가. 바이러스 저항성 야생식물의 감염시 저항성 유도 물질의 추출

TMV에 감염된 독말풀(*Datura stramonium*)의 유도 저항성을 조사한 결과 감염된 식물체의 건전잎에 2차 접종하여 나타난 병반의 크기가 약 60% 정도 감소하였다. 감염된 독말풀이나 유도 저항성을 나타낸 독말풀의 잎의 즙액을 추출하여 물질 분리 과정중 특이하게 나타나는 한 물질(형광물질)을 Column chromatography와 TLC 및 HPLC를 통해 정제하고 구조 동정한 결과 scopoletin으로 확인되었다 (그림 2). 이 물질은 coumarin 유도체로 일종의 phytoalexin이다. 이 물질은 독말풀에서뿐만 아니라 TMV에 국부병반 증상을 나타내는 저항성 담배에서도 발견되고 접종하지 않은 상위엽에도 검출된다. 또한 이 물질의 검출정도에 따라 저항성이 비례적으로 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 scopoltein은 유도저항성과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

표 18. *Datura stramonium*에서 TMV 감염에 의한 저항성 유도 효과

접종방법	병반 크기 (지름, mm)	%
1차 접종	0.89	100
2차 접종	0.37	41.6

* 2차 접종은 1차 접종 5일 후 상위엽에 TMV를 접종하였음.

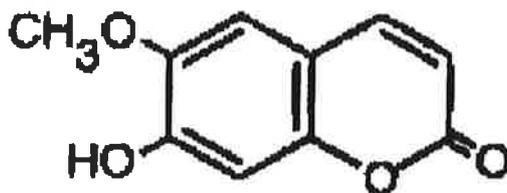


그림 2. Scopoletin의 구조식

또한 scopoletin을 담배잎에 처리한 결과 그림 3과 같이 유도저항성 물질과 관련이 있는 salicylic acid와 마찬가지로 PR 단백질 유전자의 발현이 유도되었다. 그러나 scopoletin의 농도에 비례하여 발현정도가 비례하여 증가하는 것이 아니라 500 ppm에서 발현정도가 가장 강하였다. 또한 식물에 따라 PR-1의 발현에 차이를 보여 식물의 생육에 따라 scopoletin에 대한 반응에 차이가 있을 것으로 예상된다. 그러나 salicylic acid와 동시에 처리하여 scopoletin에 대한 salicylic acid의 영향을 조사한 결과, 그 연관성이 확인되지 않았다. 따라서 scopoletin의 유도저항성 관련성 구명을 위해 보다 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

ck sa1 sa2 sa3 sc1 sc2 sc3 sc4 sc5 ck



그림 3. 저항성 유도물질 처리에 따른 PR-1 유전자 발현 조사 (Northern blot analysis)

담배의 Xanthi-nc NN의 잎에 물질 처리후 24시간 후 RNA 분리하고 PR-1 probe를 사용하여 조사함. ck: 30% acetone alone, sa1 - sa3: 1, 2 and 5 mM salicylic acid, sc1-sc5: 100, 250, 500, 750, and 1000 ppm scopoletin.

나. 항바이러스제 chrysospermin D의 작용 mechanism 조사

항바이러스 활성이 알려진 KGT 14T (*Apiocrea* sp.) 균주의 chrysospermin D를 사용하여 TMV 감염 억제 기작을 조사하였다. 이 물질의 열에 대한 안정성을 조사한 결과 표 19에서 보는 바와 같이 50℃에서는 거의 활성이 감소되지 않았고 60℃에서는 다소 감소되었고 그 이상의 온도에서는 항바이러스 활성이 유의성 있게 낮아지는 것으로 나타났다.

표 19. 온도처리에 따른 14T의 anti-TMV 효과

Temperature	Control value (%)
50℃	93.3
60℃	80.6
70℃	54.2
80℃	67.5
90℃	76.0
boiling	51.5
Control	97.4

* 처리한 잎 전체의 TMV 병반 수.

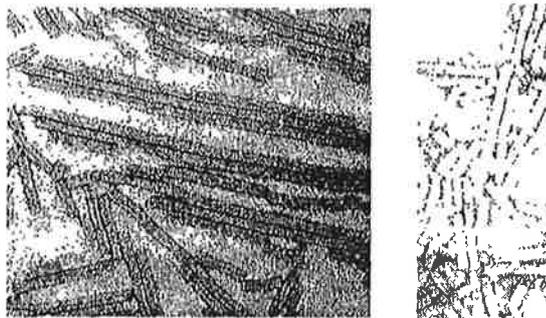
이 물질의 항바이러스 작용 기작을 조사하기 위하여 바이러스의 단백질을 불활성화시키기 전 처리와 불활성화시킨 후 RNA에 이 물질을 처리하여 이 물질이 virus의 uncoating에 관여하는지를 조사하였다. 열처리는 50℃에서 10분간 실시하였다.

이 실험결과 chryso-permin D의 항바이러스 활성은 virus 입자의 infection에 필요한 uncoating을 차단하는 것으로 나타났다 (표 20). 또한 순화한 TMV 용액에 이 물질을 25 ppm 처리하였을 때 전자현미경 상에 나타난 바이러스 입자는 uranyl acetate에 염색이 진하게 되고 바이러스 입자끼리 서로 붙어 있는 경향을 보였다. 염색이 잘 되는 것은 아마도 이 물질이 바이러스 입자와 결합되어 있기 때문이라 생각된다. 이러한 특징은 아마도 물질이 바이러스와 결합되어 있기 때문에 감염시에 바이러스입자의 uncoating을 방해하여 병원성이 있는 RNA의 식물체 침입을 방해하는 것이 아닌가 생각된다. 이의 입증을 위해서는 보다 많은 연구가 있어야 할 것이다.

표 20. 바이러스 열처리 전후 chrysospermin D 처리에 따른 항바이러스 활성 비교

구분	항바이러스제 처리	열처리후 항바이러스제 처리	항바이러스제 처리후 열처리
병반수 감소(%)	86.5	0.0	80.6

^a 3 반복 평균치. * chrysospermin 50 ppm 처리



A

B

그림 4. Chrysospermin D를 처리한 후 negative staining 한 TMV 입자 (A)와 무처리 TMV 입자(B)의 전자현미경 사진. 처리한 바이러스 입자는 더 잘게 염색이 되고 바이러스 입자가 서로 붙어 있는 경향이 있다.

제 4 절 결 론

곰팡이, 세균 등의 미생물 자원으로부터 식물바이러스 저항성 유도물질 또는 방어물질을 개발하기 위해 TMV에 저항성으로 국부병반을 형성하는 담배 품종 (Xanthi-nc NN)을 이용한 screening system을 사용하여 조사하였다. 그 결과 전체 285 균주 중 15균주의 배양액으로부터 높은 항바이러스 활성이 있음을 확인하였다. 이는 조사균주의 약 5%에 해당되는 빈도이다. 이러한 결과로 볼 때 식물 바이러스의 감염을 억제하는 미생물 유전 자원은 대단히 많이 있다고 판단된다.

항바이러스 활성을 보이는 균주 중 활성이 높고 활성물질이 비교적 안정하다고 판단되는 균주에 대해서는 대량배양하여 물질 정제를 시도하였다. 대부분의 항바이러스 물질이 비교적 친수성인 특성을 나타내었다. 곰팡이의 경우 액체배지보다 쌀배지인 고체배지에서 물질의 생산이 많아지는 경향이었고, 특성이 다른 항바이러스 물질의 생산도 관찰되었다. 예를 들어 SHR-12의 경우 액체배지에서는 항바이러스 활성이 거의 감지되지 않았고 또 n-butanol 분획에서만 활성이 나타났는데 쌀배지의 경우 n-butanol에서 뿐만 아니라 ethyl acetate 분획에서도 높은 항바이러스 활성을 나타내었다. 그러나 쌀배지에서는 1개월에서 2개월까지의 장기간의 배양기간이 요구되었다. 또한 쌀배지에서도 곰팡이 균주의 항바이러스 물질 생산량은 매우 낮은 것으로 판단되었다.

곰팡이로부터 항바이러스 물질의 개발은 물질 생산을 위한 곰팡이의 배양기간이 길고 또 생산량도 낮아 농용 바이러스제로 개발하기에는 그 실효성이 낮다고 생각된다. 본 연구에서 조사되었듯이 그 작용 mechanism 상 virus의 infection을 차단하는 방법은 잎 전체에 약액이 고루 묻어야 하는 관계로 경제적이지 못하고, 또 국부병반을 감소시킬 수는 있지만 전신적인 병을 일으키는 데는 효과가 떨어질 것이다. Scopoletin이나 salicylic acid 와 같이 저항성을 유도하는 물질은 식물체로의 침투가 어려워 그 유용성이 낮다. 따라서 항바이러스 물질은 그 자체를 농약으로 이용하기보다는 항바이러스 물질 생산과 관련된 유전자를 탐색하여 식물체를 형질전환시키는 연구가 더 필요하다고 하겠다.

세균(*Pseudomonas putida* JB-1)으로부터 분리된 물질은 단백질 성이어서 이 단백질을 이용한 유전자 cloning이 보다 용이하게 이루어질 수 있으며, 보다 우수한 균주 개발, 이 단백질 유전자의 형질전환 등에 이용될 수 있을 것이다. 또한 세균은 배양기간이 짧고, 액체배양액을 식물체에 직접 살포할 수 있으므로 농용 항바이러스제로도 유용할 것이다. 실제 일부 실험에서 담배의 감수성 품종을 이용한 전신성의 바이러스 방제도 효과를 보이고 있어서, 이 균주를 이용한 식물 바이러스 방제에 다각도의 이용이 검토되어야 할 것이다.

참고문헌

- Aoki, M., Tan, M., Fukushima, A., Hieda, T., Kubo, S., Takabayashi, M., Ono, K. and Mikami, Y. 1993. Antiviral substances with systemic effects produced by basidiomycetes such as *Fomes fomentarius*. *Biosci, Biotech. Biochem.* 57 : 278-282
- Arx, M. A. von. 1981. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*, p. 337. J. Cramer, Vaduz.
- Bodo, B., S. Rebuffat, M. E. Hajji, and D. Davoust: Structure of trichorzianine A IIIc, an antifungal peptide from *Trichoderma harzianum*. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 6011-6017, 1985.
- Bol, J. F., Linthorst, H. J. M. and Cornellissen, B. J. C. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:113-138.
- Chandra, K., Gupta, B. M. and Verma, H. N. 1981. Acquired local and systemic antiviral(TMV) resistance induced by treatment with T-poly (*Tricothecium polysaccharide*) in non-hypersensitive host plant *Nicotiana tabacum* CV. NP-31. *Curr. Sci.* 50 : 69-71
- Choi, D., Ward, B. L. and Bostock, R. M. 1992. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4: 1333-1344.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, N., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. and Ryals, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.
- Dornberger, K., Ihn, W., Ritzau, M., Gräfe, U., Schlegel, B., Fleck, W. F. and Metzger, J. W. 1995. Chrysospermins, new peptaibol antibiotics from *Apiocrea chrysosperma* AP 101. *J. Antibiot.* 48: 977-989.

- Fritig, B., Hirth, L. and Ourisson, G. 1970. Biosynthesis of the coumarins: scopoletin formation in tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* 9: 1963-1975.
- Hirai, T. 1977. Action of antiviral agents, p. 285-306. In J. G. Horsfall and E. B. Cowling (eds.), *Plant Disease. An Advanced Treatise*, vol. 1. Academic Press, New York.
- Hudson, J. B. 1990. *Antiviral Compounds from Plants*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA 200 pp.
- Kim, Y. H., Yeo, W.-H., Kim, Y.-S., Chae, S.-Y. and Kim, K.-S. 2000. Antiviral activity of antibiotic peptaibols, chrysospermins B and D, produced by *Apiocrea* sp. 14T against TMV infection. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 522-528.
- Kim, Y. H., Chae, S. Y., Kang, S. W., Yeo, W. H., Kim, Y. S., Park, E. K., Kim, S. S., Lee, S. C. 1998. Additional biological characteristics of TMV strains isolated from tobacco, tomato and pepper plants. *Korean J. Plant Pathol.* 14:371-375.
- Kim, Y. H., Choi, D., Yeo, W.-H., Kim, Y.-S., Chae, S.-Y., Park, E. K. and Kim, S. S. 2000. Scopoletin production related to induced resistance of tobacco plants against *Tobacco mosaic virus*. *Plant Pathol. J.* 16 (in press)
- Kim, Y. H., Park, E. K., Yun, H. K., Choi, D., Chae, S. Y., and Kang, S. W. 1996. Disease development in resistant tobacco plants infected with tobacco mosaic virus and expression of pathogenesis-related genes in different temperature conditions. *J. Korean Soc. Tob. Sci.* 18:21-29.
- Klement, Z., Kiraly, J. and Pozsar, B. I. 1966. Suppression of virus multiplication and local lesion production in tobacco following inoculation with a saprophytic bacterium. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1 : 11-18
- Kuc, J. 1982. Phytoalexins from the Solanaceae. In *Phytoalexins* ed.

- by J. A. Bailey and J. W. Mansfield, pp.81-105. Halsted Press, John Wiley and Sons, New York - Toronto.
- Ross, A. F. 1961. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* 14:329-339.
- Smith, D. A. 1982. Toxicity of phytoalexins. In *Phytoalexins* ed. by J. A. Bailey and J. W. Mansfield, pp.218-252. Halsted Press, John Wiley and Sons, New York - Toronto.
- Stevens, W. A. and Reynolds, T. 1992. Plant virus inhibitors from members of the Polygonaceae. *Biomedical Letters*, 47 : 269-273.
- Tanguy, J. and Martin, C. 1972. Phenolic compounds and the hypersensitivity reaction in *Nicotiana tabacum* infected with tobacco mosaic virus. *Phytochemistry* 11:19-28.
- Yeo, W.-H., Kim, Y. H., Kim, Y. S., Kim, S. S., and Chae, S. Y. Chae. 1997. Control effects of an antibiotic produced by *Streptomyces* sp. B25 on tobacco mosaic virus and determination of its molecular structure. *J. Korean Soc. Tob. Sci.* 20: 172-177.
- Yun, B.-S., Yoo, I.-D., Kim, Y. H., Kim, Y.-S., Lee, S.-J., Kim, K.-S. and Yeo, W.-H. 2000. Peptavirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection. *Tetrahedron Letters* 41: 1429-1431.

여 백

제 출 문

생명공학연구소장 귀하

본 보고서를 “병저항성 유도물질 및 식물 보호제의 생물검정에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 11. .

주관 연구 기관 명 : 한국화학연구소
연구 책임 자 : 김 홍 태
참여 연구 원 : 조 광 연, 최 경 자
김 진 철, 최 용 호
장 경 수, 손 미 정
홍 선 미

여 백

제 4 장 병저항성 유도물질 및 식물 보호제의 생물검정

제 1 절 서 설

1. 병저항성 유도물질 연구(molecules which induce disease resistance)

병저항성 유도물질에 관한 연구는 병원체와 식물의 직접접촉 없이도 식물이 병저항성 반응을 보일 수 있다는 획득저항성 현상이 알려진 후 많은 관심의 대상이 되어 왔으나 아직까지도 이런 현상을 나타내는 1차적인 signal이 무엇인지는 알려져 있지 않다(see review Enyedi, et.al. 1992, Ryals, et. al. 1994). 최근의 연구에 의하면 식물이 합성하는 물질인 salicylic acid(Ward, et. al. 1991)가 병원체의 개입 없이도 식물이 획득저항성을 나타낼 때 발현되는 pathogenesis related proteins 유전자, chitinase 유전자, glucanase 유전자, 및 peroxydase 유전자 등의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있고(Chen, et. al.1993, Rasmussen, et.al. 1991, Yalpani, et.al.1991), salicylic acid 단독 처리에 의해서도 처리된 식물 부위가 여러 가지 병원체에 대하여 저항성을 나타냄이 보고되어있다(Gaffney, et.al. 1993, Malamy and Klessig. 1992). 아미노산 유도체로 역시 식물이 합성하는 aminobutyric acid도(Chung, et. al. 1992, Crawford, et. al. 1994) salicylic acid와 유사하게 식물의 병저항성을 유도하는 것으로 알려져 있는데 Cohen등은(1994) aminobutyric acid가 처리된 토마토는 그렇지 않은 토마토에 비해서 역병의 피해를 현격히 적게 받음을 관찰하였고 이물질의 처리에 의해서 앞에서 언급된 pathogenesis related protein이 다량 축적 됨을 보고하였다. Ghaouth 등은(1994) chitosan 이 관개수를 통하여 오이 식물체에 공급되었을 때 *Pythium* 에 의한 뿌리썩음병이 현저히 줄어들고 또한 세포학적 측면에서 식물의 방어 기작이 유도됨을 보고하였다. 한편, 지방산 및 지방산유래 물질에서도 식물의 방어기

작을 유도하는 것이 보고되었다. 감자 역병균과 감자의 상호작용에서는 역병균(*Phytophthora infestans*)의 세포막에 다량 존재하는 arachidonic acid 또는 eicosapentaenoic acid가 역병균의 개입없이 항균물질인 phytoalexin 축적을 유도하고(Bostock, et. al. 1981) phytoalexin 합성에 관여하는 효소인 HMG-CoA reductase 유전자를 조절하여(Choi, et. al. 1992) 대사적인 측면과 생리적 측면에서 병저항성 반응과 동일한 반응을 보임이 보고되어있다. Jasmonic acid 또는 methyl-jasmonate는 식물의 지방산인 linolenic acid에서 유래된 물질로 Cohen 등(1993)에 의해 감자 및 토마토를 역병으로부터 보호해줄 수 있는 것이 증명되었다. 병저항성을 유도할 수 있는 물질로 알려져 있는 또 다른 예로서는 soluble silicon으로 Cherif 등(1994)에 의하면 이의 처리에 의해 오이과 식물에서 chitinase, peroxidase와 polyphenoloxidase 발현이 유도되었고 또한 silicon 처리된 식물의 추출물이 *Pythium*의 생육을 억제하는 것으로 보고하였다. 미생물에 의해서 식물의 획득저항성이 유도되는 경우도 보고되어 있는데 Maurhofer 등(1994)에 의하면 담배의 뿌리에서 정착하는 길항세균인 *Pseudomonas fluorescens*에 의해 담배 식물체가 Tobacco Necrosis Virus에 대해 저항성이 유도된다고 알려졌다. 이와 같이 미생물 또는 다른 병원체에 의한 유도 저항성은 cross protection 이라는 개념으로 설명되고 있으며 TMV와 담배, *Fusarium lateritium*과 고구마(Clark 1994) 외에도 여러 가지 식물에서 알려져 있다. 천연물에 의한 식물의 병저항성 유도기작을 이용하여 스위스의 다국적 농약회사인 Novartis사는 Salicylic acid 기능을 mimic한 화합물인 Isonicotinic acid 와 BTH를 개발하여 상업화하였으며 이는 기존의 살균제와는 완전히 다른 개념의 식물보호제로 그 기능이 살균이나 항균작용이 아닌 작물이 고유하게 지니고 있는 생체방어기작을 조절하는 식물보호제로 기존의 살균제와 구별하여 Plant Activator라고 칭해지고 있다.

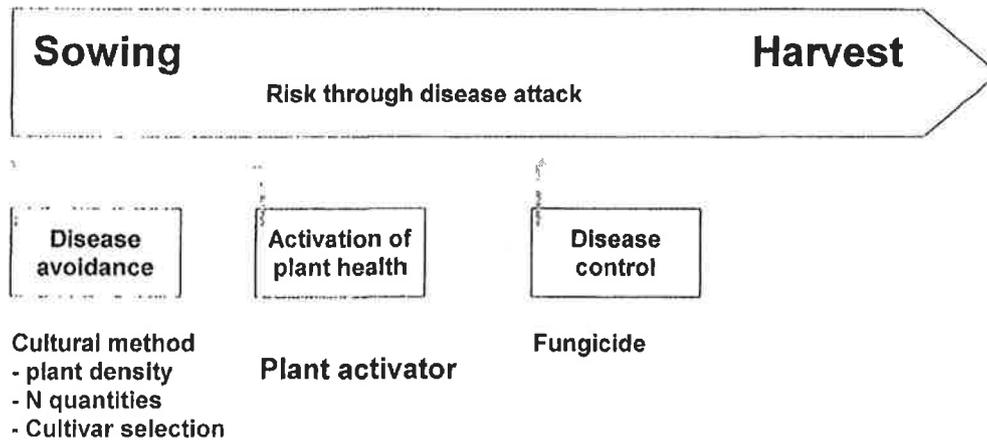


Fig. 1 The concept of plant activator

Plant activator는 병원균에 대한 살균과 항균작용이 없기 때문에 포장에서 실제 사용할 때도 사용하는 시기가 매우 중요하다. 포장에서의 plant activator의 처리 시기가 늦어져서 병이 발생한 후에 처리를 한다면 우수한 방제 효과를 얻을 수 없다. 병이 발생한 후에 plant activator를 사용하기 위해서는 기존의 살균제와의 혼합 처리를 고려해야 한다. 따라서 효과가 우수한 후보 plant activator를 선발한다고 하여도 실제 포장에서 사용할 때 예상하였던 효과를 보기 위해서는 다양한 사용 체계에 대한 연구가 수행되어야 한다.

이러한 신개념의 식물보호제는 오랜동안 축적되어온 기주-병원체의 상호작용에 대한 지식과 식물체의 고유 생체방어기능의 분자생물학을 이해함으로써 개발 방법을 확립할 수 있으며 21세기의 농업에 활용될 새로운 저독성 식물보호제로서 급속히 확산될 것으로 판단된다.

2. 식물체의 생체방어 및 관련유전자연구(Defense-related genes)

식물은 여러 가지 다양한 방법으로 외부로부터 침입해 들어오는 병원균을 방어하는데 그것은 첫째, 구조적인 벽을 만듦으로서 병원균의 침입 또는 확산을 막는 방법으로 세포벽에 lignin과 같은 물질을 축적하여 침입을 방해하는 방법, 침입된 세포자체를 죽여 버림으로서(과민성 반응) 절대 기생체인 병원체의 확산을 막은 방법 등이 바로 이것이다. 둘째는 생화화적인 방어방법인데 병원체의 생육을 억제하는 화학물질을 생합성 축적하여 병원균의 확산을 막는 방법으로 감염된 부위에 축적되는 phytoalexin 등이 이 방법에 속한다. 이와 같은 생화화적 방어기작은 오래 전부터 식물의 병저항성 기작의 하나로 많이 연구되었는데 특히 콩과식물(Leguminosae)의 isoflavonoid phytoalexin 합성과 관련하여 이의 합성에 관여하는 유전자인 phenylalanine ammonia lyase(PAL, Hoebereder et. al 1989, Bolwell, et. al. 1985, cramer, et. al. 1989) 및 chalcone synthase(CHS, Chappell and Hahlbrock, 1984, Harker, et. al. 1990, Ryder, et. al. 1984, Ryder, et. al. 1987)가 오래 전에 cloning 되었고, 병저항성 및 phytoalexin 합성과 관련한 그 생합성 경로가 많이 연구되어 있다(for review Regrand, 1983, Hahlbrock and Scheel, 1989). 한편 가지과 식물(Solanaceae)에서는 전혀 다른 경로인 isoprenoid 생합성을 통하여 phytoalexin이 합성되는데 이의 합성관련 효소인 HMG Co-A reductase(HMGR, Choi, et. al. 1992, Choi, et. al. 1994, Choi and Bostock 1994) 유전자가 cloning 되었고 sesquiterpene cyclase(SC)와 병저항성과의 관련관계가 연구되었다. 식물이 어떤 병원체에 의해 일부 괴사(necrosis)가 일어났을때 병원체에 감염되지 않은 다른 부위가 여러가지 병원체에 대해 상대적으로 저항성을 띄는 현상을 보여주는데 이를 획득저항성(Systemic Acquired Resistance)이라고 한다. 획득저항성(SAR)에 대한 기작은 오랫동안 많은 연구자들에게 흥미의 대상이 되어 왔으며 최근 이 저항성의 발현이 자연계에 존재하는 물질인 salicylic Acid 및

pathogenesis related protein(PR-protein) 축적과 관련되어 있음이 밝혀졌다(Ward, et. al. 1991, Yalpani, et. al. 1991, Rasmussen, et. al. 1991, Enyedi, et. al. 1992, Chen, et. al. 1993). 또한 이와 같은 획득 저항성의 발현과 더불어 다량 축적되는 PR-protein들에 관한 연구가 활발히 진행되어 그중 일부가 glucanase(Edelbaum, et. al. 1991) 및 chitinase임이 밝혀졌다(Beerhues and Kombrink, 1994). 또한 여러가지 아직 기능이 확인되지 않은 PR-protein들(Brederode, et. al. 1991, Rhoads and McZn tosh, 1993, Casa cuberta, et. al. 1991, Fleming, et. al. 1991, Pfitzner, et. al. 1991, Simmons, et. al. 1992, Friedrish, et. al. 1991, Pfitzner and Goodman, 1987)도 cloning 되어있다. 이러한 유도 저항성은 salicylic acid나 aminobutric acid 와 같은 에 의해서도 발현이 유도되어 여러 식물병으로부터 보호를 받을 수 있다는 사실이 알려져 있으며 Novartis 는 CGA 245704을 Agricultural Glycosystem사는 AGI 02-105F 를 개발하여 상품화 과정을 진행하고 있다.

제 2 절 연구 개발 수행 내용 및 결과

1. 병저항성 유도 물질의 스크리닝

가. 재료 및 방법

식물의 방어관련 유전자 발현 유도물질 및 감염억제제를 탐색하기 위하여 온실에서 in vivo 스크리닝을 수행하였다. 식물체 내에서 서식하는 식물내생세균을 순수 분리하여 진탕 배양한 후, 식물내생세균의 배양여액에 의한 식물보호 효과를 6 가지의 중요한 식물 진균병에 대한 방제 효과를 검정하였다.

1) 균발효액 준비 : 앞서 분리한 식물내생세균의 배양을 위하여 250ml Erlenmeyer flask에 배지 50ml을 넣고 30℃의 shaking incubator(150 rpm)에서 48시간 배양시킨 다음, 배양여액을 원심분리하여 cell을 제거한 상층액을 살균활성의 검정에 사용하였다.

2) 대상 식물병: 병 저항성 유도 물질 탐색을 위하여 스크리닝에 사용한 식물 병원균은 벼도열병균(*Pyricularia oryzae*, RCB), 벼잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*, RSB), 오이잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*, CGM), 토마토역병균(*Phytophthora infestans*, TLB), 밀붉은녹병균(*Puccinia recondita*, WLR) 및 보리흰가루병균(*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, BPM)을 이용하였다.

3) 1차 스크리닝 방법: 벼도열병은 병원균인 *Pyricularia oryzae* KJ301 균주를 쌀겨 한천배지(Rice Polish 20g, Dextrose 10g, Agar 15g, 증류수 1 L)에 접종하여 25℃ 배양기에서 2주간 배양하였다. 병원균이 자란 배지를 Rubber Polishman으로 배지표면을 긁어 기중 균사를 제거하고, 형광등이 켜진 선반(25~28℃)에서 48시간 동안 포자를 형성시켰다. 병접종은 분생 포자를 살균증류수를 이용하여 일정농도의 포자현탁액(2×10^5

conidia/ml)을 만든 뒤 약제 처리된 낙동벼(본엽 2~3엽기)에 흘러내릴 정도로 충분히 분무하였다. 접종된 벼는 습실상에서 암상태로 24시간 놓아둔 뒤에 상대습도 80% 이상이며 온도가 26°C인 항온항습실에서 5일간 발병시킨 후 병반면적을 조사하였다.

벼잎집무늬마름병(RSB)는 적당한 양의 밀기울을 1 L 배양병에 넣고 멸균한 후 병원균인 *Rhizoctonia solani* AG-1 균주를 접종한 후 25°C 배양기에서 7일간 배양하였다. 병접종은 배양된 군사덩어리를 적당하게 잘게 마쇄하여 약제처리된 3~4엽기의 낙동벼가 자란 포트에 고르게 접종하여 습실상(25°C)에서 1일간 배양 후 상대습도 80% 이상인 항온항습실에서 4일간 발병을 시킨 후 병발생은 잎집에 발병된 병반면적을 조사하였다.

잿빛곰팡이병은 병원균인 *Botrytis cinerea*를 감자한천배지에 접종하여 25°C 항온기(암상태)에서 7일간 배양한 후 하루에 12시간씩 광암을 교차하면서 다시 7일 동안 배양하여 포자를 형성시켰다. 병접종은 배지에 형성된 포자를 Potato dextrose broth로 수확하여 혈구계를 사용하여 포자농도를 2×10^5 conidia/ml로 만든 후 약제처리된 오이유묘(1엽기)에 분무접종하였다. 접종된 오이유묘는 20°C 습실상(상대습도 95% 이상)에 넣어 3일간 발병을 유도시킨 후 병반면적을 조사하였다.

토마토역병은 병원균인 *Phytophthora infestans* KA2 균주를 V-8 juice agar 배지에 접종하여 20°C 항온기(암상태)에서 7일 동안 배양한 후 광을 하루에 16시간씩 조사하면서 다시 7일 동안 배양하여 유주자낭을 형성시켰다. 병원균접종은 형성된 유주자낭을 살균증류수를 첨가하여 수확하고 광학현미경하에서 혈구계로 포자농도를 조사하여 10^5 sporangia/ml의 포자현탁액을 만들어 13°C에서 2.5시간 동안 저온 처리하여 유주자를 유출시킨 후 약제 처리된 토마토 유묘(제 2-3엽기)에 분무 접종하였다. 병원균을 접종한 토마토 유묘는 20°C 습실상에서 48시간 습실 처리한 후 20°C 항온항습실(상대습도 95% 이상)로 옮겨 4일간 발병시킨 후 병반면적을 조사하였다.

밀붉은녹병(WLR)은 병원균인 *Puccinia recondita*는 활물기생균이므로, 실험실에서 식물체에 직접 계대배양하면서 밀유묘에 형성된 하포자를 접종

원으로 사용하였다. 균주의 약효조사를 위하여 일회용 폿트(직경 : 6.5cm)에 5립씩의 밀종자(품종:조광)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 일엽기 밀유묘에 약제처리를 하고 1일 동안 풍건시킨후 포자현탁액(포자 0.67 g/L)을 분무접종하였다. 접종된 밀유묘는 20°C의 습실상에서 1일간 습실처리한 후에 상대습도가 70%인 20°C의 항온항습실로 옮겨서 발병을 유도하고 접종한지 7일 후에 병반면적율을 조사하였다.

보리흰가루병(BPM)은 병원균인 *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*는 활물기생균이므로, 실험실에서 보리유묘로 계대배양하면서 보리유묘에 형성된 포자를 접종원으로 사용하였다. 약효조사는 일회용 폿트(직경 : 6.5cm)에 5립씩의 보리종자(품종:동보리)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 제1엽기 보리유묘에 약제를 살포하고 1일 동안 풍건시킨후 약제처리된 보리에 흰가루병 포자를 털어 접종하였다. 접종된 보리유묘는 20~23°C, 상대습도 50% 정도의 항온항습실에 두어 7일간 발병시킨후 병반면적율을 조사하였다.

4) 약제의 조제 및 처리: 배양여액의 상층액은 Tween-20 용액(250ppm)에 희석하여 50ml을 준비한다. 처리는 각 대상병당 기주 식물체를 2pots씩 준비하여 총 12pots를 turn table위에 놓고 회전시키면서 spray gun(1kg/cm²)으로 식물체 전체가 골고루 약제가 부착되도록 살포한 다음 약제 처리된 식물은 48시간동안 온실에서 풍건시킨 후 병원균을 접종한다.

나. 결과 및 고찰

현재 분리한 균주중 217균주를 선발하여 6가지 식물병원균에 억제효과를 조사 하였다. 식물내생세균은 250ml Erlenmeyer flask에 배지 50ml을 넣고 30°C의 shaking incubator(150 rpm)에서 48시간 배양시킨 다음, 배양여액을 원심분리하여 cell을 제거한 상층액을 Tween-20 용액(250 ppm)에 희석하여 각 식물체에 분무 처리한 후 48시간 동안 풍건시킨 후 병원균을 접종하여 얻은 결과는 표1과 같다.

처리 균주중 16개 균주가 매우 우수한 보호효과를 보였으며, 특히 잣빛

곰팡이균을 억제하는 능력이 현저하게 확인되었다. 16개 균주중 3개균주가 병저항성 관련 유전자인 PR-1 을 유도하였다. 또한 PR-1 유전자를 유도하는 식물내생세균중 잣빛곰팡이병 및 토마토 역병에 대하여 억제효과를 보이는 균주도 다수 확인되었다.

PRIMARY SCREENING RESULT

Ksc No.	Chemical Ref.	Conc. (ppm)	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
24884	BSID712-1		80	5	47	61	0	57
24885	BSID713		41	10	15	7	0	25
24886	BSID718-1		16	5	5	0	0	12
24887	BSID718-2		16	0	71	0	93	96
24888	BSID718-3		0	0	15	0	0	25
24889	BSID718-4		25	0	26	23	88	92
24890	BSID718-5		0	0	0	0	0	0
24891	BSID718-6		0	0	15	0	0	25
24892	BSID718-7		0	10	15	23	0	72
24893	BSID718-8		16	0	5	0	0	25
24894	BSID718-9		0	10	0	0	0	37
24895	BSID718-10		98	82	89	30	96	97
24896	BSID718-11		0	5	26	23	0	70
24897	BSID718-12		0	5	0	0	0	25
24898	BSID718-13		0	0	26	0	0	65
24899	BSID718-14		0	20	0	7	0	25
24900	BSID718-15		0	10	0	0	0	57
24901	BSID718-19		41	0	36	0	86	90
24902	BSID718-20		0	15	5	0	0	87
24903	BSID720		0	5	15	0	0	45
24904	BSID723		0	5	0	0	0	57
24905	SM6		33	20	26	23	0	0
24906	SM7		63	0	0	0	0	0
24907	K3412		25	0	5	7	0	12
24908	JSS9		33	5	15	0	0	0
24909	JSS26		0	16	3	30	0	0
24910	JSS28		25	33	54	10	0	20
24911	KCCM11809		0	27	41	40	0	20
24912	KCCM11810		0	11	48	0	0	0
24913	KCCM12094		0	11	22	10	0	0

PRIMARY SCREENING RESULT

Ksc No.	Chemical Ref.	Conc. (ppm)	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
24914	SYK43934		0	44	41	30	0	0
24915	BSIS001		0	5	3	20	0	0
24916	BSIS002		0	22	29	35	0	20
24917	BSIS005		0	16	61	0	0	0
24918	BSIS006		0	5	29	20	0	20
24919	BSIS007		0	16	48	0	0	20
24920	BSIS007-2		0	16	48	0	0	40
24921	BSIS007-3		0	22	64	0	0	30
24922	BSIS008		0	0	22	0	0	10
24923	BSIS009-1		0	0	29	0	0	0
24924	BSIS009-2		0	11	61	0	0	20
24925	BSIS010-1		0	0	3	0	0	20
24926	BSIS010-2		0	5	0	0	0	20
24927	BSIS011		0	11	22	0	0	0
24928	BSIS012		0	5	35	0	0	20
24930	BSIS013-2		0	16	0	0	16	0
24931	BSIS013-3		0	5	16	0	0	40
24932	BSIS014		0	0	0	0	0	20
24933	BSIS015		0	22	54	0	16	40
25992	SB96-01	5000	16	0	3	18	0	0
25993	SB96-02	5000	0	5	31	27	0	0
25994	SB96-03	5000	0	0	51	27	0	33
25995	SB96-04	5000	0	0	10	18	0	16
25996	SB96-05	5000	0	10	0	18	0	0
25997	SB96-06	5000	0	5	37	9	0	0
25998	SB96-07	5000	0	5	51	36	0	16
25999	SB96-08	5000	0	10	0	18	0	0
26000	SB96-09	5000	33	0	0	18	0	0
26001	SB96-10	5000	0	10	24	9	0	16
26002	SB96-11	5000	0	5	68	18	0	16

PRIMARY SCREENING RESULT

Ksc No.	Chemical Ref.	Conc. (ppm)	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
26003	SB96-12	5000	0	0	91	18	0	0
26004	SB96-13	5000	0	5	51	36	0	0
26005	SB96-14	5000	0	10	44	18	0	0
26006	SB96-15	5000	0	5	24	45	0	0
26007	SB96-16	5000	0	21	17	54	0	16
26008	SB96-17	5000	16	21	0	45	0	8
26009	SB96-18	5000	0	31	44	45	0	0
26010	SB96-19	5000	16	5	0	27	0	0
26011	SB96-20	5000	33	0	10	45	0	0
26012	SB96-21	5000	0	15	10	50	0	0
26013	SB96-22	5000	0	10	44	54	0	0
26014	SB96-23	5000	16	5	3	45	0	0
26015	SB96-24	5000	0	26	3	45	0	0
26016	SB96-25	5000	0	10	10	54	0	16
26017	SB96-26	5000	0	10	37	59	0	8
26018	SB96-27	5000	16	5	37	50	0	0
26019	SB96-28	5000	16	5	17	54	0	0
26020	SB96-29	5000	16	10	0	45	0	0
26021	SB96-30	5000	16	26	24	36	0	0
26022	SB96-31	5000	0	31	68	27	0	0
26023	SB96-32	5000	16	0	44	27	0	0
26024	SB96-33	5000	0	10	62	63	0	8
26025	SB96-35	5000	0	0	75	45	0	0
26026	SB96-37	5000	0	31	37	36	0	33
26027	SB96-38	5000	0	15	17	27	0	0
26028	SB96-41	5000	0	5	51	59	0	0
26029	SB96-42	5000	16	15	62	72	0	16
26030	HWR1	5000	0*	47*	10	77*	43	0
26031	HWR2	5000	0*	68*	17*	81*	10	50
26032	HWR3	5000	0*	78*	10*	87*	16	8

PRIMARY SCREENING RESULT

Ksc No.	Chemical Ref.	Conc. (ppm)	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
26033	HWR4	5000	0*	68*	0*	84*	13	46
26034	HWR5	5000	0*	52*	17	72	23	41
26035	CSP4	5000	0*	73*	3*	81*	0	16
26036	CSP13	5000	0*	57*	37*	81*	36	16
26037	SH9308	5000	41	26	0	45	0	0
26618	JSS-1	50	0	0	3	7	0	16
26619	JSS-2	50	0	5	3	7	0	25
26620	JSS-3	50	0	0	27	0	0	0
26621	JSS-4	50	0	0	3	14	0	0
26622	JSS-5	50	0	0	9	7	0	41
26623	JSS-6	50	0	0	0	14	0	0
26624	JSS-7	50	0	30	3	14	0	0
26625	JSS-8	50	0	55	15	7	0	0
26626	JSS-14	50	0	0	33	0	0	0
26627	JSS-26	50	0	0	3	7	0	0
26628	JSS-28	50	0	0	0	0	0	16
26629	JSS-33A	50	0	0	3	21	0	16
26630	JSS-33C	50	0	5	9	7	0	0
26631	JSS-33D	50	0	0	9	35	0	0
26632	JSS-41		0	10	0	33	0	0
26633	JSS-42		0	5	0	33	0	0
26634	JSS-49		0	0	43	55	0	0
26635	JSS-50		0	5	56	44	0	0
26636	JSS-51		0	5	75	44	0	0
26637	JSS-52		0	5	50	44	0	0
26638	JSS-54		0	0	0	22	0	0
26639	JSS-57		0	0	6	44	0	0
26640	SM-6		0	0	0	22	0	16
26641	SM-7		0	5	0	44	0	0
26642	SB96-44		0	5	71	33	0	0

PRIMARY SCREENING RESULT

Ksc No.	Chemical Ref.	Conc. (ppm)	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
26643	SB96-45		0	20	0	22	0	0
26644	SB96-46		0	5	31	55	16	0
26645	SB96-47		0	10	25	33	0	16
26646	SB96-48		0	5	18	22	0	0
26647	SB96-50		0	0	0	44	0	0
26648	SB96-51		0	0	12	44	0	0
26649	SB96-52		0	5	0	44	0	0
26650	SB96-53		0	0	62	33	16	58
26651	SB96-54		0	0	25	22	0	0
26652	SB96-56		0	10	37	33	16	16
26653	SB96-57		0	0	6	61	0	0
26654	SB96-58		0	10	0	44	0	0
26655	SB96-60		0	5	0	66	0	0
26656	SB96-61		0	15	6	33	0	0
26657	SB96-63		0	5	0	50	0	0
26658	SB96-64		0	10	0	44	0	0
26659	SB96-65		0	0	18	44	0	0
26660	SB96-66		0	5	31	50	0	16
26661	SB96-67		0	0	6	44	0	0
26662	SB96-68		0	0	43	66	0	0
27074	SB96-34		16	5	37	0	26	0
27075	SB96-39		33	0	25	0	0	0
27076	SB96-40		0	0	43	8	0	0
27077	SB96-49		16	0	25	33	0	0
27078	SB96-55		33	0	68	0	0	0
27079	SB96-59		71	0	31	0	0	16
27080	SB96-62		16	0	37	8	0	0
27081	SB96-72		0	0	50	0	0	0
27082	SB96-80		0	0	43	25	0	16
27083	SB96-82		0	0	43	0	0	0

PRIMARY SCREENING RESULT

Ksc No.	Chemical Ref.	Conc. (ppm)	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
27084	SB96-89		0	0	43	16	0	0
27085	SB96-96		16	0	25	8	0	0
27086	SB96-97		16	15	56	0	0	0
27087	SB96-98		0	0	25	25	0	0
27088	SB96-99		16	0	12	25	0	0
27089	SB96-100		16	35	12	25	33	0
27090	SB96-101		33	0	12	25	0	0
27091	SB96-102		0	0	56	8	0	0
27092	SB96-103		0	0	12	8	0	0
27093	SB96-104		0	0	43	0	0	0
27094	SB96-109		0	0	0	16	0	0
27095	SB96-111		0	0	25	0	0	0
27096	SB96-115		16	0	37	0	0	0
27097	SB96-116		41	10	31	0	0	0
27098	SB96-117		33	20	62	0	0	0
27099	SB96-118		16	0	0	16	0	0
27100	SB96-119		75	0	25	33	0	0
27101	SB96-121		41	15	0	0	0	0
27102	SB96-123		0	5	0	0	0	0
27103	SB96-128		16	0	68	8	0	16
27104	SB96-135		16	0	25	0	0	16
27105	SB96-139		16	0	37	16	0	0
27106	SB96-140		33	0	56	0	0	0
27107	SB96-141		16	10	37	0	0	0
27108	2480		16	15	50	0	0	0
27109	2642		16	5	50	16	0	0
27110	9076		0	0	37	0	0	0
27111	9557		0	15	56	0	0	16
30859	48		0	40	89	5	79	76
30860	49		0	0	67	5	90	41

PRIMARY SCREENING RESULT

Ksc No.	Chemical Ref.	Conc. (ppm)	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
30861	50		0	25	22	5	54	0
30862	51		0	0	48	5	27	0
30863	52		0	0	41	17	72	16
30864	53		0	0	35	58	18	8
30865	54		0	0	83	64	77	25
30866	55		0	0	29	35	63	0
37918	PP-123		0	0	7	0	0	33
37919	PP-131		0	0	7	0	0	0
37920	PP-145		0	0	7	0	0	0
37921	PP-157		0	0	7	0	0	0
37922	PP-194		0	0	0	0	0	0
37923	PP-206		0	0	7	0	0	0
37924	PP-213		0	0	7	0	0	0
37925	PP-217		20	0	7	0	0	0
37926	PP-218		0	0	7	0	0	0
37927	PP-221		20	0	14	0	0	16
37928	PP-222		20	0	7	0	0	0
37929	PP-242		0	0	14	0	0	0
37930	PP-243		0	0	14	0	0	0
37931	PP-253		6	0	14	0	0	0
37932	PP-271		0	0	7	0	0	25
37933	PP-296		0	0	14	0	0	0
37934	PP-324		40	0	0	0	0	0
37935	PP-355		6	0	14	0	0	0
37936	PP-372		20	0	7	0	0	0
37937	PP-381		20	0	7	0	0	0
37938	PP-395		0	0	7	0	0	0
37939	PP-424		46	0	14	0	0	16
37940	PP-428		53	0	0	0	0	0
37941	PP-432		60	0	0	0	0	0

PRIMARY SCREENING RESULT

Ksc No.	Chemical Ref.	Conc. (ppm)	RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
37942	PP-522		0	0	7	0	0	0
37943	PP-507		0	0	7	0	0	0
37944	PP-502		20	0	3	0	0	0
37945	PP-500		0	0	14	0	0	0
37946	PP-482		0	0	14	0	0	0
37947	PP-524		0	0	0	0	0	0
37948	PP-521		0	0	0	0	0	0

2. 병저항성을 유도하는 농업 소재의 탐색

식물에서 병에 대한 저항성을 유발하는 소재로는 미생물뿐만 아니라 기존의 물질로는 제초제, 식물생장조절제, chitosan 등이 알려져 있다. 본 실험에서는 이러한 다양한 소재에 대하여 병저항성 유도 능력을 실험하고자 하였다.

가. 식물병에 대한 제초제의 살균활성 및 Piperophos의 벼도열병 방제 효과
농약개발을 위하여 일반적으로 수행되는 방법은 활성이 뛰어난 기존의 화합물을 변화시켜 신규 화합물을 합성하는 me too 방법이다. 이 방법은 신규 작용점을 지니는 새로운 골격의 화합물을 선별하기는 어렵지만, 생리활성이 알려진 화합물을 변형시켜 화학 합성을 실시하기 때문에 빠른 시간내에 효율적으로 신규 화합물을 찾을 수 있는 장점을 가지고 있다. 기존의 살균제 중에는 제초제의 기본 골격을 바탕으로 유도체를 합성하여 개발한 약제들이 알려져 있다. 벼잎집얼룩병과 감자역병 등에 뛰어난 활성을 보이는 pencycuron과 metalaxyl은 phenylurea와 acylalanine계 제초제로부터 유도체를 합성하여 개발한 살균제이다(5, 15). 제초제뿐만 아니라 기존의 다른 용도의 화합물이 살균제로서의 활성을 보이는 예도 있다. 식물에서 생장조절제로서의 활성을 보이는 1-naphthaleneacetic acid는 토마토에서 병저항성을 유도하여 시들음병을 유발하는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*를 방제한다고 보고되어 있다(2). 만약 기존에 사용하고 있는 여러 계열의 제초제를 공시하여 살균제로서의 활성 검정을 실시한다면, 살균제로서의 가능성을 지닌 화합물의 선별이 가능하리라고 생각한다.

본 실험실에서는 병방제 효과를 갖는 선도 화합물을 탐색하기 위하여 기존의 제초제들을 스크리닝하였다. 17개 계열의 45개 제초제를 선별하여 6 가지의 중요한 식물병에 대해 병방제 효과를 조사하였으며, 그 중에서 벼도열병에 대하여 우수한 효과를 보이는 piperophos를 선별하여 작용 특

성 실험을 수행하였다.

1) 재료 및 방법

사용 병원균: 벼도열병균(*Pyricularia grisea*), 벼잎집얼룩병균(*Rhizoctonia solani*), 오이갯빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)는 PDA(potato dextrose agar, Difco 제품) 사면배지에 배양하여 4°C에서 보관하였다. 토마토역병균(*Phytophthora infestans*)은 V-8 juice agar 배지에 배양하여 실온에서 보관하였다. 병원성 유지를 위하여 한 달에 한 번씩 각각의 기주식물에 접종하고 재분리하여 실험에 사용하였다. 절대기생균인 보리흰가루병균(*Erysiphe graminis*)과 밀녹병균(*Puccinia recondita*)는 동보리와 은파밀에서 1 주일 간격으로 계대배양하며 실험에 사용하였다.

약제의 조제 및 처리: 공시한 모든 제초제는 acetone에 녹인 다음, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 tween 20 수용액을 이용하여 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 조제하였다. 이 때 acetone의 최종 농도는 10%로 조절하였다. 벼도열병에 대한 약제의 예방 및 치료효과를 조사하기 위해서, 병원균을 접종하기 1일 전과 접종한 1일 후에 준비한 20 ml의 약액을 벼를 심은 3 개의 포트에 고르게 경엽처리하였다. 이 때 사용한 벼의 품종은 낙동이며, 한 포트 당 3립의 종자를 파종하여 온실에서 재배하였다. 침투이행 효과는 병원균을 접종하기 1일 전에 정해진 농도의 약액을 토양에 5 ml씩 관주처리하여 효과를 조사하였다. 또한, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 piperophos를 벼에 경엽처리하고 1일, 3일, 5일 후에 병원균을 접종하여, 약제효과의 지속성을 실험하였다.

병원균의 접종: 벼도열병균의 포자 형성을 위하여 쌀겨배지(쌀겨 200 g, dextrose 20 g, agar 20 g)를 사용하였다. 25°C의 쌀겨 배지에서 10일간 배양한 도열병균의 공중균사를 제거하고 형광등을 2일간 조사하여 포자를 형성시켰다. 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 tween 20 수용액으로 포자를 수확하고 4겹의 cheese cloth로 여과하여 균사 조각을 제거하였다. 포자농도를 1.0×10^6 개/ml로 조절하여 2~3엽기의 벼에 분무접종하였다. 25°C에서 1일간 습실 처리한 후 발병을 유도하기 위하여 동일 온도의 항온항습실(절대습

도;>90%)로 옮겨서 5일동안 재배하였다. 공시한 약제의 효과는 약제 무처리구와 약제 처리구의 엽당 발병 면적을 조사하고 무처리구에 대한 방제가를 산출하여 구하였다. 벼잎집얼룩병을 비롯한 나머지 5 가지의 식물병에 대해서는 한국화학연구소의 스크리닝 방법에 준하여 실시하였다(1).

벼도열병균의 포자 발아 및 군사 성장 억제효과: 살균 증류수를 이용하여 5.0×10^5 개/ml의 포자현탁액을 준비하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 piperophos를 포자 현탁액에 처리하여 정해진 농도로 조절하였다. 이 때 DMSO의 최종농도는 1%가 되게 희석하였다. Hole slide glass에 포자 현탁액을 0.2 ml씩 점적한 후 petri dish에 넣어 25°C의 암상태에서 1일간 배양하였다. Petri dish에는 2장의 여과지를 깔고, 5 ml의 살균 증류수를 부어 습도를 유지하였다. 포자 발아는 광학현미경으로 반복당 100개의 포자를 조사하였으며, 모든 처리는 4반복으로 실시하였다. Piperophos의 군사성장 억제효과는 한천희석법을 사용하여 조사하였다. PDA 배지를 petri dish에 붓기 전에 DMSO에 녹인 piperophos를 배지에 첨가하여 약제 농도를 공시한 농도로 조절하였다. 포자발아 실험 때와 동일하게 DMSO의 최종농도는 1%로 맞추었다. PDA 배지에서 5일간 배양한 벼도열병균의 군사 선단에서 직경 5 mm의 군사 조각을 떼어내어 약제 배지에 접종하였다. 25°C에서 5일간 배양한 후 균총의 직경을 조사하여 억제 정도를 산출하였다.

Absciscic acid(ABA)의 처리효과: 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 piperophos를 2~3엽기의 벼잎에 경엽처리하였다. 병원균은 piperophos를 처리하고 1일 후에 앞에서와 동일한 방법으로 접종하였다. ABA처리가 piperophos의 방제효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 병원균을 접종하기 4시간 전에 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ABA를 잎에 처리하고 풍건시켰다.

2) 결 과

제초제의 살균 활성: 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리에서 piperophos는 벼도열병과 벼잎집얼룩병에, bialaphos는 토마토 역병에, linuron은 밀붉은녹병에 대

하여 90% 이상의 살균활성을 보였다(Table 2). Butachlor와 bialaphos는 오이잣빛곰팡이병에 대하여 80%이상의 활성을 보였다. 그러나 대부분의 제초제들은 6가지의 식물병에 대하여 70%이하의 낮은 방제효과를 보였다. Piperophos, bialaphos, linuron의 처리 농도가 낮아지면 Table 3에서 보는 바와 같이 방제효과가 감소하였다.

Piperophos의 도열병 방제효과. Piperophos는 벼 도열병에 대하여 처리농도에 따른 예방효과는 뛰어났지만, 치료효과와 침투이행효과는 매우 미미하였다(Fig. 2). 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 piperophos는 약제처리 1일 후에 92.5%의 병방제 효과를 보였으며, 5일 후에도 방제효과가 60% 지속되었다(Fig. 3). 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리구는 80%였던 방제효과가 5일 후에 40% 미만으로 떨어져 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리구보다 빠르게 약효가 감소하였다.

Piperophos의 벼도열병균에 대한 작용특성: 벼도열병균의 포자는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 piperophos 처리구에서 100% 발아되지 않았다. 동일 농도에서의 균사생장 억제효과는 40%에 그쳤다(Fig. 4). Piperophos는 포자발아 억제효과가 균사생장 억제효과보다 강하였다. 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 piperophos를 처리한 벼에 병원균을 접종하기 전에 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ABA를 전처리하여도 piperophos의 병방제 효과는 감소하지 않았다(Fig. 5).

3) 고 찰

공시한 제초제 중에서 piperophos, bialaphos, linuron 등은 벼도열병과 벼잎집얼룩병, 토마토 역병, 밀붉은녹병 등에 90% 이상의 살균활성을 보였다(Table 2). 그중에서도 piperophos는 벼에 대하여 전혀 약해를 유발하지도 않으면서 농도에 따라 높은 예방효과를 나타내었기 때문에 piperophos의 도열병에 대한 작용특성을 조사하였다.

Piperophos는 organophosphorous(OP)계열의 제초제이다. Piperophos와 같은 OP계의 화합물은 오래 전부터 살균·살충·제초제로 개발되어 사용되고 있다(3). 벼도열병 방제 약제에도 organophosphorus계열에 속하는 iprobenfos, edifenphos, isoprothiolane 등이 있다(7, 8, 9, 10, 14).

1970년 일본에서 개발된 iprobenfos는 도열병균의 포자 발아 억제뿐만 아니라 군사 생장 억제효과가 높으며, 식물체상에서의 예방효과뿐만 아니라 치료와 침투이행 효과도 높은 것으로 보고되어 있다. 그러나 온실의 풋트실험에서 piperophos는 예방효과를 제외한 치료 및 침투이행 효과가 인정되지 않았다. 이는 piperphos가 포자발아 억제효과가 높기 때문에 예방효과가 높았던 반면에, 군사생장 억제효과는 낮아서, 이미 식물체 조직내로 군사가 침입한 후에는 치료효과가 미미하였을 것으로 생각한다.

많은 제초제는 식물체의 생리 작용을 조절하는 능력을 가지고 있다. 식물체가 병원균에 대하여 저항성을 나타내는 기작도 식물의 호르몬과 같은 생리현상과 관련이 깊어, 식물 호르몬과 식물병 저항성의 관계에 관한 보고가 많이 되어 있다(4, 6, 13). 특히 abscisic acid (ABA)는 식물의 저항성과 관련된 효소의 활성을 저해하기 때문에 병발생을 촉진한다고 알려져 있다(11, 12). Piperophos가 식물체의 병저항성 유도에 관련이 있는지의 여부를 판명하기 위해서 ABA를 처리하고 병방제 효과가 감소하는지를 조사하였지만, ABA 처리에 의한 병방제효과의 감소는 없었다. 결국 piperophos는 벼도열병균의 포자 발아를 직접적으로 억제하여 벼도열병을 방제하였다.

본 실험에서 piperophos는 벼도열병에 대해서 좋은 살균활성이 있음이 확인되었다. 그러나 치료 효과 및 침투이행효과의 부족으로 piperophos를 단독으로 도열병의 방제약제로 사용하기에는 어려울 것이다. 약제의 제형을 변화시키거나, 다른 약제와의 혼합처리 등 사용방법에 대한 지속적인 연구가 진행된다면 새로운 형태의 도열병 방제약제로서의 사용도 가능하리라 생각한다. 또한 본 실험의 근본적인 목표였던 신규물질 합성을 위한 선도물질로서 새로운 농약의 합성에 이용할 수도 있으리라고 생각된다. 본 연구를 기초로 실제 포장에서의 piperophos의 사용 방법의 개선과 지속적인 유도체의 합성이 이루어진다면 논에서의 일년생 잡초 방제와 더불어 벼도열병을 동시에 방제할 수 있는 방제법과 새로운 살균제의 개발이 가능하리라 생각한다.

Table 2. Controlling effect of herbicides on several plant diseases

Chemical classes	Compounds	(µg/ml)	Plant diseases ^a					
			RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
Amide	Mefenacet	500	0 ^b	31	12	77	0	12
	Propanil	500	33	5	36	65	73	0
Carbamate	EPTC	500	58	5	0	0	0	0
	Molinate	500	63	5	44	0	0	0
	Thiobencarb	500	8	15	12	0	0	25
Dinitroaniline	Nitralin	500	0	12	- ^c	56	33	0
	Pendimethalin	500	41	30	55	38	0	16
	Trifluralin	500	8	6	37	0	0	0
Diphenylether	Bifenox	500	16	30	20	17	0	-
	Chlormethoxynil	500	58	25	37	-	-	-
	Chlornitrofen	500	0	20	12	10	-	-
	Nitrofen	500	0	18	50	0	-	-
	Oxyfluorofen	500	16	50	43	-	-	-
Diazine	Bentazone	500	25	20	36	24	0	62
	Oxadiazon	500	8	30	30	0	-	-
	Pyrazoxyfen	500	0	20	28	3	0	0
	Pyrazolate	500	25	30	60	31	53	0
Halo acetamide	Butachlor	500	0	20	84	3	16	0
	Metolachlor	500	50	10	0	0	0	0
	Pretilachlor	500	8	5	28	10	16	0
Nitrile	Dichlobenil	500	0	15	50	0	0	33
Phenol	Dinoseb	500	11	70	-	-	-	-
Phenoxy	Fenoxaprop ethyl	500	0	15	40	0	0	-
	Fluazifop buthyl	500	58	30	52	10	-	-
	MCPA	500	0	12	-	62	-	25
	Napropamid	500	0	18	37	-	46	0
	Naproanilide	500	33	6	-	-	50	37
Phosphorous	Bialaphos	500	-	-	85	95	-	-
	Glyphosate	500	41	5	12	0	-	12
	Piperophos	500	95	93	36	17	-	-
Pyridazin	Credazine	500	0	25	10	23	0	8
	Norflurazon	500	0	15	73	0	-	-
Pyridine	Picloram	500	0	18	-	-	43	25
Sulfonylurea	Bensulfuron methyl	500	16	31	56	43	0	-
	Pyrazosulfuron ethyl	500	33	18	25	25	50	62

(Continued)

Chemical classes	Compounds	Conc. ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Plant diseases ^a					
			RCB	RSB	CGM	TLB	WLR	BPM
Triazine	Metribuzin	500	0 ^b	31	31	25	- ^c	-
	Prometryne	500	0	37	25	25	66	-
Carbamate	Simetryne	500	0	37	50	50	-	-
	Terbumeton	500	0	10	30	0	-	-
Uracil	Bromacil	500	0	20	20	61	-	-
Urea	Dymron	500	0	18	62	12	0	25
	Linuron	500	16	35	72	0	99	-
	Metabenthiazuron	500	0	15	65	0	66	-
Miscellaneous	Perfluidon	500	33	31	62	52	70	-
	Quinclorac	500	0	18	12	-	26	0

^aAbbreviations were indicated as follows, RCB: rice blast, RSB: rice sheath blight, CGM: cucumber gray mold, TLB: tomato late blight, WLR: wheat leaf rust, BPM: barley powdery mildew

^bFigures are indicated as the control value(%).

^cThe controlling effect of herbicides was not evaluated because of the phytotoxicity in plants applied them.

Table 3. Preventive effect of three herbicides treated by leaf spray one day before inoculation at low applied concentrations

Chemical classes	Compounds	Plant Diseases ^a	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	
			50	100
Phosphorous				
	Bialaphos	TLB	0 ^b	0
	Piperophos	RCB	8.9	81
		RSB	0	40
Urea				
	Linuron	WLR	0	93

^aAbbreviations were indicated as follows. RCB; rice blast, RSB; rice sheath blight, TLB; tomato late blight, WLR; wheat leaf rust

^bFigures are indicated as the control value(%).

나. 식물생장조절제의 도열병 방제효과

식물체에서 병에 대한 저항성이 발현될 때는 병저항성과 관련있는 유전자와 단백질 등이 출현함과 더불어 식물체 내의 효소활성이 변화하게 된다. Ethylene의 발생, lipoxigenase의 활성 증대, phytoalexin의 축적과 증가, 병저항성 관련 효소(peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanin amylase 등)의 활성 증가 등은 식물체에서 병에 대한 저항성이 발동될 때 나타나는 현상으로 이미 많은 연구자에 의해서 보고되어 있다. 또한 지금까지 병저항성을 유도한다고 보고되어진 살균제는 식물체에 경엽처리하기 보다는 토양에 관주처리하였을 때 그 효과가 현저하게 증가하였다. 본 실험은 식물체 내에서 병에 대한 저항성이 발현될 때 생리적인 많은 변화를 수반함에 착안하여, 식물의 성장·생리에 영향을 미치는 성장조절제를 선발하여 토양에 관주처리하고서 병방제 효과를 조사하였다. 토양 관주처리에서 우수한 방제효과를 보이는 화합물은 담배에 처리하여 병저항성 유전자의 유기를 확인하였다.

1) 재료 및 방법

◦ 식물생장조절제

Auxin활성제 : 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid(2, 4-D),
Indolbutyric acid(IBA)

Auxin활성 억제제 : Triiodobenzoic acid(TIBA)

GA 활성제 : Gibberellic acid(GA3)

GA 활성 억제제 : Inabenfide

Cytokinin 활성제 : BA, Kinetin

Ethylene 발생제 : Ethephon

기 타 : Abscisic acid(ABA)

◦ 기주식물

벼도열병균에 대해 감수성인 낙동벼를 직경 4.5 cm의 일회용 포트에

3립씩 파종하고, 온실에서 4 - 5 엽기까지 재배하여 실험에 사용하였다.

◦ 화합물의 처리

공시한 식물생장조절제를 acetone을 사용하여 용해시킨 다음, 250 ppm의 Tween 20용액으로 희석하여 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 조제하였다. 이 때 아세톤의 최종농도는 10%였다. 준비한 생장조절제액은 실험 포트당 5 ml씩 경엽 또는 토양 관주처리하였다.

◦ 병원균의 접종 및 발병

화합물을 처리하고 3일 후에 병원균을 분무접종하였다. 250 ppm의 Tween 20을 이용하여 쌀겨배지에서 형성된 벼도열병균의 포자를 수확하고, 포자현탁액의 농도는 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 로 조정하였다. 접종한 벼는 26°C에서 1일간 습실처리하고 항온항습실(온도: $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도: >80%)로 옮겨서 발병을 유도하였다. 접종하고 7일 후에 식물체의 병반면적율을 조사하여 효과를 구하였다.

◦ 선발한 식물생장조절제의 농도확인실험

- 생장조절제 : 2,4-D, IBA, TIBA, Ethephon

- 처리방법 및 농도 : 경엽 및 토양관주처리

500, 250, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (포트당 5 ml씩 처리)

◦ 성체식물에서의 방제효과

- 생장조절제 : Indolbutyric acid(IBA)

- 처리방법 및 농도 : 토양관주처리 (2.56, 0.51 kg/10 a)

- 기주식물 : 3엽기의 낙동벼를 1/5,000a 와그너포트에 이식하여 수잉기 직전까지 재배한 후 실험에 사용하였다.

2) 결 과

◦ 일차 스크리닝 결과

- 토양 관주처리를 통하여 2,4-D, IBA, TIBA는 98.9%, 97.8%, 88.9%의 효과를 보였다. 그러나 2,4-D의 경우 벼에 심한 약해를 유발하였다. Ethephon과 ABA는 58.9%의 효과를 보였고, 나머지 화합물은 효과는 20%

이하로 저조하였다.

- 경엽처리에서는 약해가 발생한 2,4-D와 Ethephon의 처리에서 92.2%와 58.9%의 효과를 보였다. IBA의 처리에서는 무처리한 대조구보다도 심하게 발병하였다.

○ 농도 확인 실험 결과

- 화합물을 경엽처리하였을 때 2,4-D를 제외한 나머지의 효과는 미미하였다. 2,4-D의 경우는 앞의 실험에서와 동일하게 경엽과 토양 관주처리의 모든 농도에서 약해가 발생하였다.
- 공시한 화합물을 토양 관주처리하면 IBA의 처리가 약해도 보이지 않았으며, 방제효과도 높았다. 형성된 병반도 진전되지 않는 저항성 병반을 나타냈다.

○ 성체 실험 결과

IBA의 처리에서 63.9%의 효과가 인정되었다. 그러나 IBA의 벼에 대한 약해, 수확량에 미치는 영향 등을 지속적으로 검토하여야 한다.

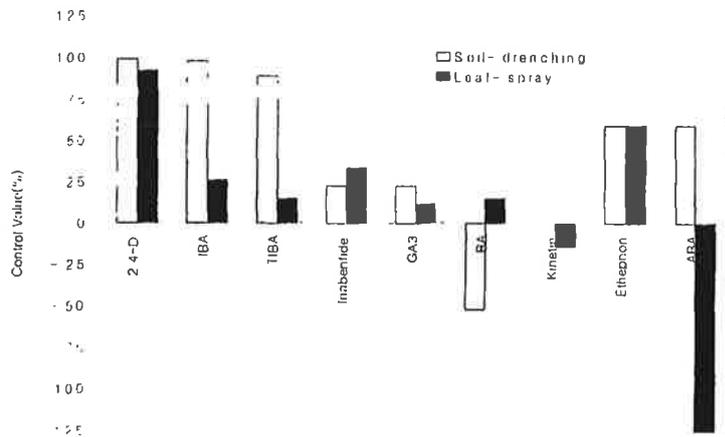


Fig. 6 Controlling effect of several plant growth regulators on rice blast

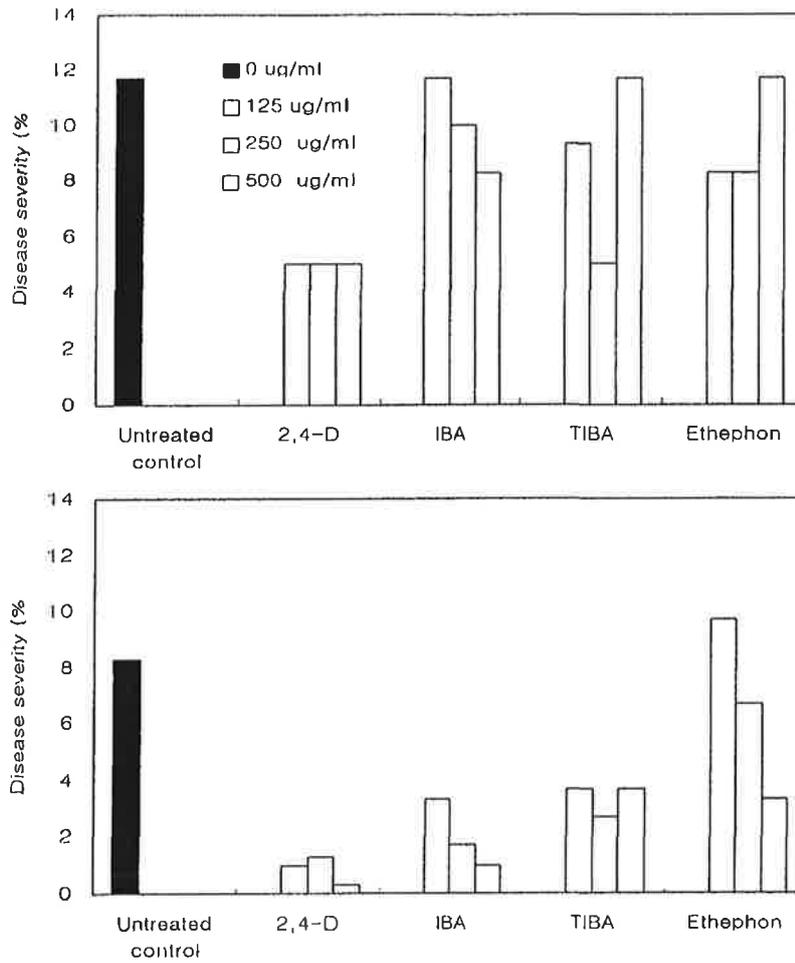


Fig. 7 Confirmatory test of the activity of several plant growth regulators on rice blast by leaf spray(up) and soil drenching(down) 3 days before inoculation.

Table 4 Systemic effect of indolbutyric acid and triiodobenzoic acid on rice blast by soil drenching into the adult of rice

다. 키토산 처리에 의한 배추 무사마귀병의 방제 효과

Chemicals	Dose	Disease severity (%)	Control value (%)
Indolbutyric acid	2.56 kg/10 a	6.5	63.9
	0.51 kg/10 a	21.5	0
Triiodobenzoic acid	2.56 kg/10 a	9.5	47.2
	0.51 kg/10 a	21.5	0
Untreated control		18.0	

합성 농약이 환경과 잔류에 대한 문제 때문에 사용에 많은 제한을 받으며 천연물 제제에 대한 관심과 이용도가 높아가고 있다. 이러한 천연물 중에서 키토산의 유도체로서 계, 새우와 같은 갑각류의 주요 성분인 키토산은 최근 많은 관심의 대상이 되며 사용상의 새로운 시도가 이루어지고 있다. 키토산은 지구상에서 섬유소 다음으로 풍부한 물질이지만 오랫동안 관심을 끌지 못하고 있었다. 그러나 생체와의 높은 친화성 때문에 의료용으로 사용되면서 관심이 높아지고 농업적인 측면으로의 이용을 위해서도 많은 시도가 행하여지고 있다. 특히 식물병 방제에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다. 토마토의 토양 병원균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*에 대한 항균 활성 및 종자 피복에 의한 병 진전 억제 효과, 오이의 수경 재배 시에 발생하는 *Pythium apanithermatum*에 대한 뿌리 부패병에 대한 방제 효과, 딸기의 저장 중에 발생하는 *Botrytis cinerea*와 *Rhizopus stolonifer*에 의한 부패병 방제 등이 보고되어 있다. 키토산은 식물 병원균에 대한 항균활성뿐만 아니라 phytoalexin과 chitinase의 elicitor의 축적, 리그닌화의 촉진, 식물의 병 저항성에 관련하는 chitinase, β -1,3-glucanase와 같은 효소의 유도에도 관련한다는 보

고들이 있다.

농업의 현장에서는 키토산이 종자 처리용이나, 토양 처리용으로 사용되고 있다. 본 실험실에서는 수용해도가 다른 키토산을 선별하여 최근 십자화과 식물의 중요한 토양병으로 문제가 되고 있는 배추 무사마귀병에 대한 방제 실험을 수행하였다.

1) 실험 방법

○ 기주식물의 준비 및 병원균의 접종

충남 서산의 배추 재배지에서 무사마귀병에 감염된 배추의 뿌리를 수집하여 -70℃에 보관하며 접종원으로 사용하였다. 일회용 포트(직경 5 cm)에 원예용 상토를 담고 7립의 배추 종자를 파종하였다. 일주일간 온실에서 재배한 후 생육이 균일한 3주만 남기고 다른 유묘는 제거하였다. 병원균의 접종은 배추 유묘에 키토산의 용액을 토양 관주 처리하고 3일 후에 감염 뿌리의 현탁액을 포트 당 10 ml씩 토양에 접종하였다. 접종원으로 사용한 감염 뿌리의 현탁액은 냉동실에서 보관한 감염된 배추 뿌리 98 g을 증류수에 갈아서 2겹의 cheeze cloth로 찌꺼기를 여과하여 준비하였다.

○ 키토산의 처리

수용해도가 서로 다른 3 종류의 키토산을 1%의 lactic acid 용액을 이용하여 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125%의 농도로 조절하였다. 각각의 용액은 단독으로 혹은 서로 혼합하여 실험 포트당 30 ml씩 토양관주 처리하였다.

○ 병 발생 및 조사

무사마귀병균을 접종한 배추는 온실에서 적정 수준으로 토양 수분을 조정하면서 관리하였다. 병 발생 정도는 병원균을 접종하고 한 달 후에 토양을 제거하고 뿌리에 발생한 뿌리혹의 정도를 아래의 발병 지수로 조사하였다.

발병 지수	0	:	뿌리혹이 발생하지 않음
	1	:	측근에만 뿌리혹이 발생
	2	:	주근에만 뿌리혹이 발생
	3	:	주근과 측근 모두에 뿌리혹이 발생

○ 배추의 건물중 측정

병 발생과 키토산 처리에 의한 배추의 생육 저해를 조사하기 위하여 배추의 지상부에 대한 건물중을 조사하였다. 뿌리를 제거한 배추의 지상부를 신문지로 싸서 50℃의 열풍 건조기에서 48시간 건조시켰다. 실온까지 열풍 건조기의 온도가 떨어진 후 건조시킨 배추의 무게를 측정하였다.

2) 결과 및 고찰

- A와 B의 경우는 동일한 농도에서 비슷한 효과를 보였다(표 5).
- 수용해도가 가장 우수하였던 C의 경우는 효과가 나타나지 않았다.
- 3종류의 키토산을 서로 다른 조합으로 혼합하여 토양에 처리하였을 때, 협력 작용에 의한 효과의 상승은 찾아 볼 수 없었다(표 6).
- 키토산의 토양관주 처리에 의해서 배추가 약해를 받아 건물중이 감소하는 결과는 얻지 못하였다(표 5).
- 키토산의 적정 처리 농도, 처리방법 등에 대해서는 후반기의 대형 풋트 실험에서 계속적으로 확인되어야 한다.
- Chitosan은 최근 농업의 새로운 방제 소재로 크게 주목을 받고 있는 물질이다. Chitosan은 그 단독의 처리에 있어서도 식물병에 대한 방제 효과가 인정되고 있으며, 직접적으로 병원균의 생육을 억제하기도 한다. 또한 일정 농도의 처리에서 식물체 내에서 저항성을 유도하기도 한다. 본 실험에서도 국내에서 심하게 문제가 되고 있는 무사마귀병에 대한 방제 효과가 본 실험을 통하여 확증되었다. 이 결과는 미생물을 이용하여 식물체에서 저항성을 유도하고 토양병을 방제하고자 할 때 새로운 방제의 소재 혹은 제형화시에 첨가제로서 사용되어질 수 있는 가능성을 제공한다.

표 5 키토산의 토양 관주 처리에 의한 배추 무사마귀병 방제

키토산의 종류	관주처리한 용액의 농도 (%)	방제 효과 (%)	건물중(g/주)
A	2.0	96	1.01
	1.0	70	1.06
	0.5	74	1.10
	0.25	15	0.97
	0.125	30	0.81
	0.0625	11	0.91
	B	2.0	78
1.0		98	0.95
0.5		52	0.91
0.25		11	0.94
0.125		7	0.87
0.0625		0	0.96
C		2.0	11
	1.0	15	0.91
	0.5	4	0.98
	0.25	9	0.92
	0.125	15	0.83
	0.0625	9	1.02

표 6 키토산의 혼합처리에 의한 방제 효과

처리한 키토산과 농도	방제 효과 (%)
1% A + 1% A	81
1% A + 1% B	61
1% A + 1% C	80
1% B + 1% B	89
1% B + 1% C	37
1% C + 1% C	7
0.5% A + 0.5% A	70
0.5% A + 0.5% B	78
0.5% A + 0.5% C	48
0.5% B + 0.5% B	67
0.5% B + 0.5% C	19
0.5% C + 0.5% C	4
0.25% A + 0.25% A	35
0.25% A + 0.25% B	33
0.25% A + 0.25% C	19
0.25% B + 0.25% B	46
0.25% B + 0.25% C	22
0.25% C + 0.25% C	7
0.13% A + 0.13% A	7
0.13% A + 0.13% B	0
0.13% A + 0.13% C	11
0.13% B + 0.13% B	15
0.13% B + 0.13% C	13
0.13% C + 0.13% C	28

3. 무사마귀병 방제를 위한 식물내생세균의 스크리닝

십자화과 작물에 커다란 피해를 유발하고 있다. 병원균인 *Plasmodiopsis brassicae*는 토양 중에서 휴면 포자를 형성하여 7 - 8년을 연속적으로 생존할 수 있기 때문에 한 번 감염된 토양을 치료하기란 매우 어렵다. 또한 무사마귀병에 대한 방제 약제로는 일본에서 개발된 fruazinam과 flusulfamide 밖에 없기 때문에 가장 효율적인 화학적 방제를 수행하기에도 많은 어려움이 있다. 토양 중에서의 전반도 유주자를 통하여 이루어지기 때문에 빠른 시간 내에 넓은 면적이 감염될 위험이 높으며, 토양에 약제를 처리해야 하기 때문에 처리 상에도 많은 제약이 있다.

최근 국내의 많은 배추, 무 재배 지역에서 본 병이 발생하고 있으나 뚜렷한 방제제가 개발되어 있지 않고, 저항성 품종의 육종 또한 큰 실효를 보지 못하기 때문에 방제가 어려운 식물병이다. 이처럼 1993년부터 배추 재배지역에서 심각한 문제를 초래하고 있는 무사마귀병에 대한 스크리닝 방법을 확립하고, 다양한 식물체로부터 분리한 endophyte를 처리하여 병방제효과와 배추의 생육에 미치는 효과를 조사하였다.

가. 재료 및 방법

◦ 접종원의 보관 및 준비

*P. brassicae*는 절대활물기생균이기 때문에 인공배지 상에서의 배양과 보관이 불가능하다. 본 실험실에서는 전남 해남 지역과 경기도 연천 지역에서 이병 식물의 뿌리와 토양을 채취하여 방제제 선발 실험을 진행하였다. 이병 식물의 뿌리는 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

이화학연구소에서는 *P. brassicae*를 실험실 내에서 배양하면서 실험에 이용할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 카루스 배양하는 배추에 병원균을 접종하며 병원성을 조사하였지만 다량의 포자가 형성되지 못하였으며, 형

성된 포자 역시 기주식물체에 대하여 병원성이 떨어졌다. 결국 포장에서 감염된 식물의 뿌리를 채집하여 냉동보관하는 방법이 가장 문제가 없는 것으로 밝혀져 있다. 그러나 1년 3개월 이상 냉동보관을 하면 병원성이 떨어지기 때문에 오래 보관하였던 식물체의 조직은 일정 기간마다 새로운 감염 뿌리를 채집하여 교체하며 사용한다.

사마귀병에 감염된 뿌리 20g을 500 ml의 인산buffer(pH 7.0)에 넣고 1-2분간 분쇄한다. 4겹의 가제로 걸러서 식물조직의 찌꺼기 등을 제거하고 유주자의 농도를 1×10^7 /ml로 조절하였다.

◦ 약제의 조제

기존의 살균제를 모두 공시하여 각 살균제의 방제 효과를 일차적으로 검증하였다. 모든 살균제는 DMSO에 용해시켜 Tween 20 (250 ppm)용액에서 정해진 농도로 희석하여 토양에 관주 처리하였다. 일차 스크리닝에서 효과가 인정되는 살균제는 처리 농도를 희석하며 방제효과를 조사하였다. 또한 기존에 무사마귀병의 방제약제로 사용되는 PCNB, chlorothalonil(TPN), trichlamide를 공시하여 성체 식물 실험을 수행하였다.

◦ 식물체의 준비, 약제처리 및 발병

스크리닝을 위한 품종 선발을 위하여 몇 가지 품종에 대하여 병원성 실험을 실시한 결과,

흑진주 품종이 본 병원균에 대하여 가장 감수성이었으며 뚜렷한 병징이 형성되어, '흑진주'를 약제의 스크리닝에 사용하기로 하였다 (그림 8).

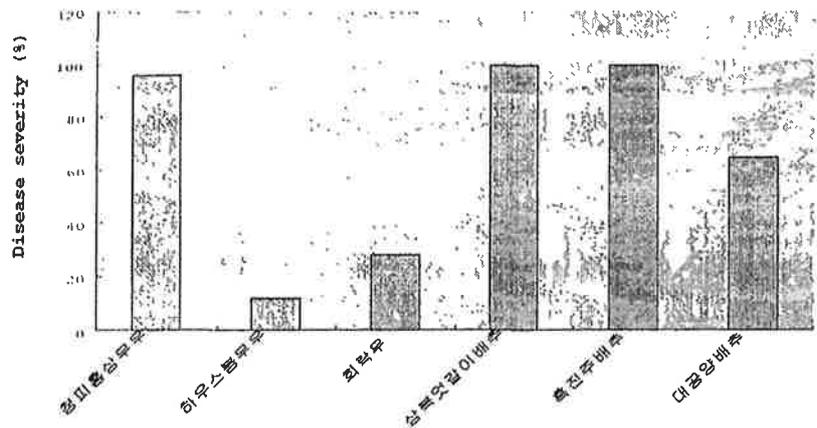


그림 8 무사마귀병에 대한 배추 품종 별 병원성 실험

플라스틱 포트에 부농 상토를 담고 상토의 표면이 젖을 정도로 관수하였다. 준비한 접종원을 포트당 5 ml씩 토양에 관주처리하였다. 준비한 살균제는 정해진 약량으로 조절하여 포트 당 30 ml씩 관주처리하였다. 약제 처리 후 포트당 6 - 7립의 배추를 파종하여 22 - 26℃, 일조량 12시간, 습도 50%되는 온실로 옮겨서 발병을 유도하였다.

• 발병조사

파종하고 40일 후에 포트에서 배추를 뽑아 물로 잘 씻어 유관으로 뿌리의 상태를 관찰하여 검정하였다. 조사는 아래와 같은 발병 지수를 사용하여 발병도를 구하고 효과를 계산하였다.

- 0 : 뿌리혹균이 전혀 감염되지 않은 것
- 1 : 측근의 일부에 뿌리혹착생
- 2 : 측근과 주근의 일부에 뿌리혹착생
- 3 : 근전체에 뿌리혹착생

$$* \text{ 발병도}(\%) = \frac{3 \times (\text{지수 3의 식물체 수}) + \dots + 1 \times (\text{지수 1의 식물체 수})}{3 \times (\text{전체 조사한 식물체 수})} \times 100$$

나. 결과 및 고찰

배추를 파종하고 30일 후에 병원균에 의한 발병 정도를 배추 뿌리를 보고서 조사하였다. 표 7에서 보는 바와 같이 기존의 다른 살균제의 효과는 미미하였다. 다만, captafol과 nuarimol의 처리에서 73 g/10a과 46 g/10a의 IC₅₀의 효과를 보였다.

일차 스크리닝을 통하여 5 종류의 기존 살균제를 선발하여 무사마귀병에 대한 방제효과를 조사하였다. Flusulfamide를 0.18 kg/ml로 처리하였을 경우에는 병 발생이 100% 억제되어 가장 우수한 방제 효과를 보였다. Trichlamide, ferimzone 등은 0.7 kg/ml의 처리에서 80% 이상의 효과를 보였다 (그림 9).

무사마귀병의 기존 약제로 사용하는 살균제의 성체식물 실험에서는 약제를 처리하지 않았던 무처리구에서는 78.6%의 병이 발생하였으며, 뿌리가 포장에서와 동일하게 비대성장하여 뚜렷한 병징을 보여 주었다. 지상부에서도 생육에 많은 차이를 보였다. PCNB, chlorothalonil(TPN), trichlamide의 2.0 g a.i./m²의 처리구에서는 95.3%, 76.8%, 88.2%의 효과를 보였다(표 8). 그러나 1.0 g a.i./m² 처리구의 효과는 51.7%, 65.4%, 33.0%로 감소하였다.

표 7 기존 살균제의 무사마귀병 방제 효과

Chemical class	Chemical	IC ₅₀ (g/10a)
Anilide	Flutolanil	553
Antibiotics	Blasticidin-S	>2800
	Polyoxin B	>2800
	Validamycin	>2800
Azole	Flusilazole	>2800
	Imazalil	1271
	Prochloraz	>2800
	Triflumizole	>2800
	Triforine	>2800
	Thiophanate-methyl	238
Benzimidazole	Thiophanate-methyl	238
Carbamate	Diethofencarb	1203
Carboximide	Mepronil	>2800
Dicarboximide	Iprodione	>2800
	Procymidone	>2800
Dithiocarbamate	Mancozeb	298
	Propineb	822
Phenylamide	Metalaxyl	>2800
Pthalide	Folpet	241
Phthalimide	Captafol	73
Pyrimidine	Nuarimol	46
N-Trihalomethylthio	Dichlofluanid	>2800
	Captan	>2800
Urea	Pencycuron	>2800
Others	Chlorothalonil	372
	Dimethomorph	>2800
	Ferimzone	>2800
	Fosetyl-Al	>2800
	Isoprothiolane	>2800
	Pthalide	>2800

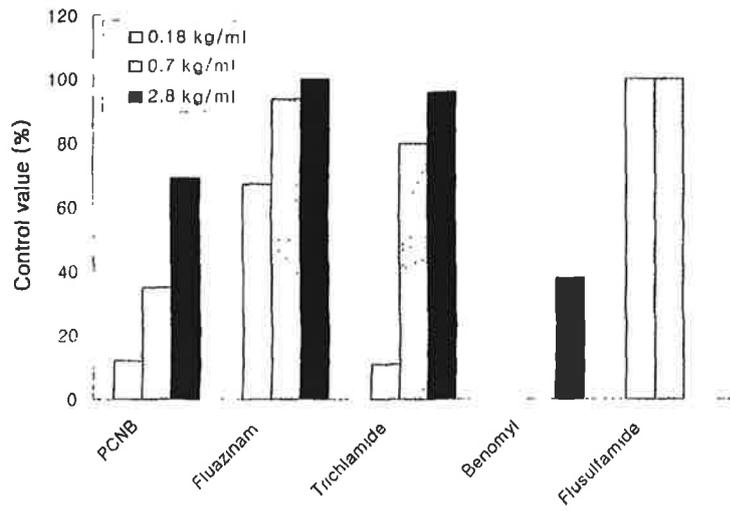


그림 9 무사마귀병에 대한 기존 살균제의 온실 실험 효과

표 8 무사마귀병에 대한 3가지 살균제의 방제효과

Chemicals	Application (g a.i./m ²)	Disease severity (%)	Control value (%)
Pentachloronitrobenzene(PCNB)	2.0	3.7	95.3
	1.0	38.0	51.7
	0.5	66.7	15.1
Chlorothalonil(TPN)	2.0	18.2	76.8
	1.0	27.2	65.4
	0.5	69.7	11.3
Trichlamide	2.0	9.3	88.2
	1.0	52.7	33.0
	0.5	69.0	12.0
Untreated control	-	78.6	

이 병은 세계적으로 광범위하게 분포된 십자화과식물의 주요한 토양병 중의 하나이다. 특히 일본에서는 전국적으로 퍼져 있다고하며, 우리나라에서도 남부지방에서 다발생하여 피해가 점차 확산되고있는 상태이다. 그러나 방제약제로 PCNB(pentachloronitrobenzene)가 있으나 고약량(50kg/10a)을 사용하므로 PCNB의 분해산물인 PCA(pentachloroaniline)의 대량잔류에 의한 잔류독성과 어독성의 문제가 있어 조만간 사용이 중지될 것이라 고 한다. 최근 저항성품종이 개발되었으나 저항성이 완전치않고 뿌리혹병의 잠복기가 10-20년으로써 100%방제가 불가능하다고한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 이화학연구소의 미생물제어 연구실에서 PCNB의 분해균에 대한 연구를 계속하고 있으며, 최근 *Phoma glomerate* No. 324에서 생리활성물질인 epoxidone을 발견하였으며, 이 화합물은 다른 균주에 대해서는

활성을 나타내지 않고 무사마귀병에 대해서만 선택적으로 방제효과를 보이고 있다고 한다. 이것은 epoxidone이 식물체중에서 Auxin활성을 억제함으로써 발병을 억제하기 때문이다. 병원균에 의하여 침입받은 식물체의 뿌리에서는 auxin의 분비가 촉진되어 세포분열이 이상적으로 증가함에 따라 흑이 형성된다. 따라서 일본의 이화학연구소에서 실시하고 있는 것과 같이 auxin 억제제에 대한 실험을 수행하는 것도 방제의 한 가지 전략이라고 본다. 병원균은 토양 중에서의 환경이 악화되면 휴면포자를 형성하므로써 10년 이상 생존할 수 있는 형태로 버틴다. 살균제를 토양처리하여 당해연도에 병원균을 방제하였다고 할지라도 한 번 발생하였던 토양에서는 10년 이상 계속 발병 가능성을 지니고 있기 때문에 지속적인 방제 전략이 필요하다. 또한 휴면포자의 발아나 생육을 억제할 수 있는 신규 살균제의 개발도 요구된다.

무사마귀병에 대한 피해는 확대되어가고 뚜렷한 방제약제가 없는 것이 현 상황이다. 따라서 본 병에 대한 스크리닝 방법을 확립하고 약제를 선별할 수 있는 실험을 활성화시켜 무사마귀병을 효과적으로 방제할 수 있는 약제를 개발한다면 앞으로 유망한 살균제로 이용될 것으로 기대된다.

* Endophyte의 무사마귀병 방제 스크리닝

총 6회에 걸쳐서 347개의 미생물의 무사마귀병 방제효과를 조사하였다. 현재 우수한 효과를 보였던 미생물에 대한 확인 실험을 진행 중에 있다.

참 고 문 헌

1. 조광연. 1989. 신규농약개발을 위한 스크리닝체제 확대 발전. 한국화학연구소 보고서. pp 601-669.
2. Corden, M. E. and Dimond, A. E. 1959. The effect of growth-regulating substances on disease resistance and plant growth. *Phytopathology* 49 : 68-72.
3. Eto, M. 1997. Functions of phosphorus moiety in agrochemical molecules. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 : 1-11.
4. Hale, M. G., Roane, C. W. and Huang, M. R. C. 1962. Effect of growth regulators on size and number of leaf spots, and on O₂ uptake and extension growth of coleoptile sections of corn inbred lines K41 and K44. *Phytopathology* 52 : 185-191.
5. Hubele, A., Kunz, W., Eckhardt, W. and Sturm, E. 1983. The fungicidal activity of acylalanines. In *Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment*, vol. 1, *Synthesis and Structure-activity Relationships*, 5th International Congress on Pesticide Chemistry, August 1982, ed. P. Doyle and T. Fujita, pp 233-242. Oxford, Pergamon Press.
6. Iwata, M., Sekizawa, Y., Iwamatsu, H., Suzuki, Y. and Watanabe, T. 1981. Effects of plant hormones on peroxidase activity in rice leaf and incidence of rice blast. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 47 : 646-653.
7. Kanauchi, M. Uchida, M and Tsuchiya, K. 1982. Persistence of isoprothiolane in paddy water and rice plants after submerged applications. *J. Pesticide Sci.* 7 : 377-383.
8. Katagiri, M. and Uesugi, Y. 1977. Similarities between the fungicidal action of isoprothiolane and organophosphorus thiolate fungicides. *Phytopathology* 67 : 1415-1417.

9. Kodama, O., Yamashita, K. and Akatsuka, T. 1980. Edifenphos, inhibitor of phosphatidylcholine biosynthesis in *Pyricularia oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 44 : 1015-1021.
10. Maeda, T., Abe, H., Kakiki, K. and Misato, T. 1970. Studies on the mode of action of organophosphorus fungicide, Kitazin Part II. Accumulation of an amino sugar derivative on Kitazin-treated mycelia of *Pyricularia oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 34 : 700-709.
11. Matsumoto, K., Suzuki, Y., Mase, S., Watanabe, T. and Sekizawa Y. 1980. On the relationship between plant hormones and rice blast resistance. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46 : 307-314.
12. Sekizawa, Y. and Watanabe, T. 1981. On the mode of action of probenazole against rice blast. *J. Pesticide Sci.* 6 : 247-255.
13. Sijpesteijn, A. K. 1969. Mode of action of phenylthiourea, a therapeutic agent for cucumber scab. *J. Sci. Food Agric.* 20 : 403-405.
14. Uesugi, Y. and Tomizawa, C. 1971. Metabolism of *o*-ethyl *s*, *s*-diphenyl phosphorodithioate (Hinosan) by mycelial cells of *Pyricularia oryzae*. *Agr. Biol. Chem.* 35 : 941-949.
15. Yamada, Y., Saito, J. and Takase, I. 1988. Development of a new fungicide, Pencycuron. *J. Pesticide Sci.* 13 : 375-387.

본 연구와 관련하여 출판된 논문

1. Moom-Kyung Kang, Kyung-Soon Park, and Doil Choi. 1998. Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco. *Mol. cells*, 8: 388-392.
2. Hae-Keun Yun, So-Young Yi, Seung-Heun Yu, and Doil Choi. 1999. Cloning of a pathogenesis-related protein-1 from *Nicotiana glutinosa* L. and its salicylic acid-independent induction by copper and β -aminobutyric acid. *J. Plant Physiol.* 154:327-333.
3. Sang-Keun Oh, Jong-Joo Cheong, Ingyu Hwang and Doil Choi. 1999. Similarities of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive cell death and copper-induced abiotic cell death in tobacco. *Plant Pathol. J.* 15(1):8-13.
4. Kyung-Soon Park, Mi Chung Suh, Jong-Joo Cheong and Doil Choi(2000). Isolation of defense-related genes from *Nicotiana glutinosa* infected by tobacco mosaic virus using a modified differential screening. *Plant Pathol. J.* 15(5):295-301.