

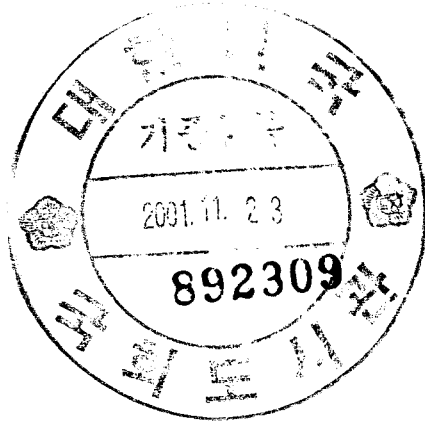
최 종
연구보고서

Paraquat 내성 신품종 목초의 개발과 Paraquat 내성유전자의 발현조절

Development of Forage Plants Tolerant to Paraquat and
Expression Regulation of the Paraquat Resistance Gene

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

농 립 부



최 종 보 고 서

1997년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 Paraquat 내성 신품종 목초의 개발과 paraquat 내성유전자의 발현조절에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2001년 10월 28일

주 관 연 구 기 관 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 조진기 (인)

주관연구기관장 :

직인

농림부장관 귀하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Paraquat 내성 신품종 목초의 개발과 paraquat 내성유전자의 발현조절” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 28일

주관연구기관명:	경	북	대	학	교
총괄연구책임자:	조		진		기
연 구 원:	손		대		영
연 구 원:	원		성		혜
세부과제책임자:	김		장		억
연 구 원:	김		종		수

요 약 문

I. 제목 : Paraquat 내성 신품종 목초의 개발과 paraquat 내성 유전자의 발현조절

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 농업은 잡초와의 전쟁

농업의 역사는 잡초와의 싸움이라고 해도 과언이 아니다. 그러므로 잡초방제가 잘 될수록 농업생산력이 향상하고 있음을 농업의 역사에서 알 수가 있다. 기원전 1000년까지는 쟁기에 의하여 잡초가 제거되었으므로 농부 한 사람이 두 사람의 식량분 밖에 생산할 수 없었으나, 1920년 트랙터의 출현으로 잡초의 방제가 한결 쉬워지면서 8명분의 식량을 생산 할 수 있게 되었으며, 1947년경부터 처음으로 제초제가 생산보급되기 시작하면서 생산성이 급격히 증가하여 농부 한 사람이 16명분의 식량을 생산할 수 있게 되었다. 그 이후, 다양한 선택성을 가진 제초제의 개발과 다른 농업기술의 발달에 힘입어 미국에서는 1980년대에는 농부 한 사람이 38명분의 식량을 생산 할 수 있게 되었다. 이와 같이 제초제가 발달할수록 생산성이 급격히 증가함을 알 수 있으며 잡초는 농업생산을 떨어뜨리는 가장 큰 요인이 된다. 우르과이라운드 합의 이후 식량 경쟁이 내외적으로 더욱 치열해져가고 있다. 이에 대처하기 위해서는 안정성을 가진 고수익성의 농업을 실시하고 농작물 생산비의 절감 및 고품질 농산물의 생산이 필수적이며, 이를 극복해 나가는데 있어 잡초 방제의 효율성 및 안전성이 중요한 요소가 되고 있다.

2. 비선택성 제초제 내성유전자를 도입한 목초개발의 효과

제초제에는 다양한 선택성이 있다. 단자엽 식물에 효과가 있는 제초제가 있는가 하면, 광엽 잡초에 효과가 있는 제초제도 있고 또한, 모든 식물을 한꺼번에 살초하는 제초제도 있다. 선택성의 제초제를 사용할 경우, 작물을 보호한다는 이점은 있지만 작물과 비슷한 생리적 특성을 가진 잡초는 제거 할 수 없게 된다. 반대로 비선택성의 제초제를 사용하면 모든 잡초를 제거 할 수는 있지만 작물도 함께 피해를 입게 된다. 미국의 농경지 면적은 약 6억 ha로 1971년도의 잡초에 의한 피해가 약 \$ 25억 이었다는 보고가 있다. 우리나라의 농경지 면적은 약 200만 ha이고 ha당 피해액 (減收, 除草人件費, 除草濟貸 包含)을 100,000원으로 보면 연간 2,000억원이 손실될 것으로 예상된다. 목초지의 경우, 잡초의 침입으로 생산성이 떨어지게 되면 초지의 갱신을 해야한다. 그러나 만약 제초제 내성을 가지는 유전자를 분리하여 목초에 도입함으로써 제초제 내성 형질전환 식물을 개발한다면 초지의 갱신없이도 질이 좋고 생산성이 높은 목초지를 연속적으로 유지 할 수 있다.

3. Paraquat이란 어떤 제초제인가?

Paraquat은 비홀몬형의 접촉형, 비선택성 제초제로서 1958년 미국 ICI사가 그라목손이라는 상품명으로 개발하였으며, 개발된지 오래되어 이미 물질특허의 기간이 지났으므로 국내에서 자유롭게 생산 판매되고 있다. 우리나라에는 1970년에 들어와 24.5%의 액제로써 파수원잡초제거용으로 사용되어 왔으며, 어린잎에서부터 성숙한 잎에 이르기까지 경엽처리로 신속히 체내에 흡수되어 살초시키는 속효성 제초제이다. 이 제초제의 작용기작은 paraquat이 광합성의 명반응계에서 전자를 받아 환원이 되고, 환원된 paraquat이 세포 내의 전자전달계를 이용하여 대기중의 산소 (三重項酸素, O_2^{-3})를 환원시켜 superoxide (O_2^-)를 만들며, 이때 과다하게 생성된 superoxide를 처리하지 못하는 세포는 사멸하고 마침내 개체도 죽게되므로 살초 효과가 나타나게 된다.

4. Paraquat의 환경오염 문제는 심각한가?

Paraquat을 포함한 모든 제초제와 농약이 사용 후에 환경오염이라는 문제를 야기하게 된다. 그러므로 가급적이면 농약류를 사용하지 않거나 환경친화성 농약 또는 생물농약을 사용함으로써 환경문제를 적게 일으키는 것이 가장 이상적이라 할 수 있다. 그러나 적절한 생물농약이 개발되지 않은 상황 하에서 농약사용의 중단은 곡물생산량의 급격한 감소라는 새로운 문제를 야기하게 될 것이다. 그러므로 여러 가지의 농약들 중에서 가장 환경에 영향을 덜 미치면서 효과가 높고 경제성을 가진 농약을 엄밀하게 선택해야할 필요성이 있다. Paraquat은 모든 생물세포에 대하여 독성을 가지지만 살포된 paraquat은 태양에 노출되면 자외선에 의하여 쉽게 분해되며, 토양에 접촉된 것은 접촉과 동시에 토양에 강하게 흡착되므로 하천을 오염시킬 염려는 거의 없다. 한 보고서에 의하면 12년간 paraquat을 사용한 토양으로부터 추출한 추출물에서 paraquat이 거의 검출되지 않았다고 한다. 그러므로 많은 비선택성 제초제들 중에서 paraquat은 환경 친화적인 경향의 제초제라고 볼 수 있다. 본 연구의 제2세부과제에서 paraquat이 논토양에서 토양에 흡착, 탈착 및 미생물 또는 UV에 의한 분해기작을 밝혀냄으로써 사용된 paraquat이 가급적 환경을 덜 오염시키는 문제에 대한 해답을 주게 될 것이다.

5. Paraquat 내성목초 재배시에는 제초제 사용량을 현격히 줄일 수 있다.

Paraquat 내성유전자를 가진 목초를 재배할 경우, paraquat을 사용하더라도 목초에는 해가 없을 것이라는 안도감 때문에 필요 이상의 paraquat을 사용함으로써 말미암아 환경오염이 더 가중되지 않을까 하는 우려가 있을 수 있다. 그러나 실제로는 그렇지 않다. Paraquat 내성이 없는 목초를 초지에서 제초하기 위해서는 여러 가지의 선택성 제초제를 수 회에 걸쳐 사용해야하지만, paraquat 내성유전자를 가

진 목초를 재배하는 초지에서는 적절한 시기에 단 한 번의 paraquat 사용으로 제초가 가능하기 때문에 제초제 사용 총량을 월등하게 줄일 수 있다.

6. Paraquat의 경제성

Paraquat은 개발된지 오래되어 이미 물질특허의 기간이 지났으므로 국내에서 자유롭게 생산판매되고 있다. Paraquat과 같은 비선택성 제초제 중에는 근사미(Glyphosate)와 Basta가 있으며, 근사미는 미국의 몬산토社에서 특허권을 가지고 있으며 Basta는 일본의 메이지제약에서 특허권을 가지고 있으므로 이들 두 제초제는 paraquat에 비하여 월등하게 비싸다.

7. Paraquat 내성유전자의 분리에 성공

본 연구책임자의 연구실에서는 3년 전부터 미생물로부터 paraquat 내성유전자를 분리하기 위한 연구에 착수하여 많은 시행착오 끝에 비로소 이 유전자의 분리에 성공하였다. 우리나라의 많은 연구실에서 비선택성 제초제인 bialaphos에 대하여 내성을 가지는 유전자인 *bar* gene과 glyphosate에 대하여 내성을 가지는 glyphosate 내성유전자에 대하여 상당한 연구가 진행되고 있으며 상당한 성과가 있는 것이 사실이다. 그러나 glyphosate 내성유전자는 미국의 몬산토社에서 특허권을 가지고 있으며, 다른 제초제 내성유전자인 *bar* gene은 일본의 메이지제약에서 특허권을 보유하고 있으므로 이들 유전자로 형질전환 식물을 만든다고 하더라도 특허료를 지불하지 않고는 사용할 수가 없다. Paraquat 내성유전자는 아직 어느나라에서도 특허를 출원한 바 없으며, 본 연구책임자의 연구실에서 처음 분리하였으므로 이 유전자를 이용한 형질전환 작물의 개발은 많은 경제성을 지닌 것으로 판단된다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

제 1 세부과제 : Paraquat 내성유전자의 발현기구 해명 및 paraquat 내성목초 개발

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기 분리한 paraquat 내성 유전자의 확인 및 구조해명 2. 목초 재분화계 및 형질전환계 확립 	<ol style="list-style-type: none"> 1. DNA sequencing, 타 유전자들과의 homology 비교, 유전자의 구조해명 2. 국내 재배 품종 재분화계 확립, <i>Agrobacterium</i>을 이용한 형질전환계 확립
2차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. Paraquat 내성유전자 영역의 확정 2. Paraquat 내성유전자 산물의 특성해명 3. Paraquat 내성유전자의 식물체 도입 및 검정 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 영역확정을 위한 deletion clone의 작성, Paraquat의 농도별 처리, Paraquat 내성유전자 영역의 확정 2. 단백질의 특성해명, 단백질과 paraquat과의 interaction 확인 3. Paraquat 내성유전자의 도입, 온실에서 순화, 형질전환 확인
3차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. Original 세균에서 paraquat 내성 관련 유전자의 선발 2. 제초제 저항성식물의 유전양식 조사 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Southern hybridization에 의한 paraquat 내성유전자의 염색체 상에서의 확인, Genomic DNA library작성, Paraquat 내성유전자의 선발, 조절 영역의 특성해명 2. 형질전환체의 자가수정 및 kanamycin 내성 test, Northern blot에 의한 발현량 조사, 발현량에 따른 내성관련 조사
4차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. Paraquat 내성유전자 전사조절 유전자의 분리 2. Paraquat 내성식물의 생육 특성조사 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Paraquat 내성유전자 상류와 하류영역의 sequencing, Gene mapping, 전사조절 유전자의 분리, Promoter의 탐색, 제어인자의 정제, 항체작성 2. 종자로부터 도입 유전자의 우열성 조사, 생육시기별 paraquat 내성조사, homozygote 식물의 육성, 형질전환 식물의 종자 확보

제 2 세부과제 : Paraquat의 토양 환경 중 동태

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1 차 년 도	Paraquat의 흡착양상규명	① 토성에 따른 흡착양상, ② 점토광물 및 유기물에 의한 흡착양상, ③ 수분함량에 따른 흡착양상, ④ 온도, pH 및 경쟁 양이온에 따른 흡착양상
2 차 년 도	Paraquat의 탈착양상규명	① 물, pH, 계면활성제에 의한 paraquat의 탈착양상 규명 ② 전기 영동에 의한 paraquat의 탈착양상 규명 ③ Paraquat의 토양 중 분해 반감기 규명 ④ Incineration에 의한 토양 중 paraquat의 분해 소실양상 규명 ⑤ α -Cyclodextrin, sulfur에 의한 토양 중 paraquat의 분해양상 규명 ⑥ 미생물에 의한 paraquat의 분해규명
3 차 년 도	Paraquat의 미생물에 의한 분해 규명	① α -Cyclodextrin에 의한 분해 및 분해과정의 규명 ② Sulfur에 의한 분해 및 분해과정을 규명 ③ Oxalic acid에 의한 분해 및 분해과정의 규명 ④ 미생물에 의한 분해 및 분해과정의 규명 ⑤ 광에 의한 분해 및 분해과정의 규명
4 차 년 도	토양에 흡착된 paraquat의 remediation	① Cyclodextrin의 형태별 remediation 기작 연구 ② ATS에 의한 remediation 기작 연구 ③ Microcosm에 의한 remediation 기작 연구 ④ Oxidative catalyts에 의한 remediation 기작 연구

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구개발 결과

가. 제 1 세부과제 : 「Paraquat 내성유전자의 발현기구 해명 및 paraquat 내성목초 개발」 과 관련된 연구개발 결과

Paraquat 내성유전자의 발현기구의 해명을 위하여 토양으로부터 선발한 paraquat 내성 미생물인 *Ochrobactrum anthropi* JW-2의 genomic DNA로부터 paraquat 내성 유전자 (*pqrA*)와 조절단백질 유전자 (*pqrR1*과 *pqrR2*)를 분리하여 그 특성을 규명하였다. Paraquat 내성유전자 (*pqrA*)를 모델식물인 담배에 형질전환한 다음, *pqrA* 유전자의 과발현에 의한 paraquat 내성의 획득을 확인하였다. Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 화분과 목초인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스의 캘러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립한 다음, *pqrA* 유전자를 형질전환하여 paraquat에 대한 내성의 획득을 확인하였으며, 이상의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) Paraquat 내성유전자의 선발

토양으로부터 비선택성 제초제인 paraquat에 내성을 가지는 미생물 JW-2를 분리하였다. 분리한 미생물의 형태학적, 생리, 생화학적 특성 및 세포지방산 조성 등을 조사한 결과, 분리 균주 JW-2는 *Ochrobactrum anthropi*로 동정되었으며 최종적으로 *O. anthropi* JW-2로 명명하였다. Paraquat에 대한 내성을 대조균인 *E. coli* JM105와 비교하였을 때 paraquat 100 mM에서 *E. coli* JM105는 전혀 성장하지 못하였으나, *O. anthropi*는 paraquat 무첨가구와 비교하였을 때 약 70% 정도까지 성장하였다.

Paraquat 처리시 대조균인 *E. coli* JM105는 superoxide dismutase (SOD)의 활성

이 증가하였으나 *O. anthropi* JW-2는 SOD 활성의 변화를 나타내지 않아 paraquat에 대한 내성이 세포 내 항산화효소의 활성 증가에 의한 것이 아닌 다른 방어기작으로 인한 것임을 나타내었다. *O. anthropi* JW-2는 paraquat과 같은 redox-cycling compound인 plumbagin과 menadione에 대해서는 내성을 나타내지 않았으며, paraquat 이외의 다른 농약류에 대해서도 내성을 나타내지 않았다. 따라서, *O. anthropi* JW-2가 paraquat에 대하여 내성을 가지는 것은 세포막 단백질의 작용에 의해 paraquat이 세포 내로 유입되는 것을 선택적으로 저해하거나, 세포 내로 유입된 paraquat을 세포 외로 능동적으로 배출하는 작용에 의한 것으로 추정되었다.

O. anthropi JW-2의 genomic DNA library로부터 *E. coli*에 paraquat 내성을 부여하는 2.5 kb DNA 단편을 cloning하였다. 2.5 kb의 DNA 단편이 도입된 *E. coli*는 대조구보다 6배 이상 높은 paraquat 내성을 나타내었으며, 이 DNA 단편을 *pqr*로 명명하였다. *pqr* 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 총 길이는 2,520 bp였으며, 한 개의 완전한 ORF와 두 개의 불완전한 ORF로 구성되어 있었다. 발견된 한 개의 완전한 ORF인 *orf1* (position 643-1875)은 1,230 bp와 410개의 아미노산으로 구성되어 있었고 추정되는 단백질의 분자량은 42 kDa이었다. 또한 *orf1*의 5' 상류에는 원핵생물 유전자의 공통 promoter 서열인 TTGACA (-35)와 TTTAAT (-10)가 개시코돈 ATG로부터 각각 80 bp와 56 bp 상류영역에 존재하였으며, ribosome binding site (AAGGA)도 개시코돈으로부터 10 bp 상류영역에 존재하는 것으로 나타났다. 따라서, *orf1*을 *pqrA* 유전자로 명명하였고, 그 유전자 산물을 PqrA로 명명하였다.

2) Paraquat 내성유전자의 특성 및 발현기구 해명

PqrA 단백질은 hydrophobic 잔기가 전체 아미노산 잔기의 53%를 차지하였으며, 11개의 transmembrane helices 구조로 되어 있었다. 또한, helix 5와 6 사이에는 membrane의 cytoplasmic side로 추정되는 큰 hydrophilic loop가 있었다. BLAST

system을 이용하여 PqrA의 아미노산 서열의 상동성을 검색해 본 결과, 약제 내성 및 transporter 단백질들과 상동성을 나타내었는데 특히, EmrB, SmvA, TetA 그리고 LmrP와 같은 membrane transporter로 기능하는 단백질들과 높은 상동성을 나타내었다.

pqrA 유전자를 도입한 *E. coli*의 활성산소 발생 약제들에 대한 특이성을 조사한 결과, menadione과 plumbagin에 대해서는 내성을 나타내지 않았다. 그러나 paraquat과 같은 pyridylum계 제초제인 diquat과 paraquat과 같은 양이온 화합물인 ethidium-bromide (EtBr)에 대해서는 내성을 나타내었다. PqrA의 *O. anthropi* JW-2에서의 존재 위치를 immunoblot 분석으로 조사한 결과 PqrA 단백질은 membrane fraction에서만 관찰되었다. 이상의 결과로부터 PqrA 단백질은 paraquat이 세포 내로 유입되는 것을 저해하거나 세포 내로 유입된 paraquat을 세포 밖으로 배출시킴으로써 paraquat 내성을 부여하는 것으로 판단되었다. *pqrA* 유전자의 발현 양상을 조사하기 위하여 paraquat을 처리한 다음 northern blot 분석을 실시한 결과, 발현량의 차이를 나타내지 않아서 *pqrA* 유전자가 paraquat에 의해 발현이 유도되는 것이 아니라 항상적으로 발현하는 유전자임을 알 수 있었다.

pqrA 유전자와 인접해있는 *orf2* 및 *orf3*의 full-length clone을 각각 분리한 다음, DNA 염기서열을 결정하여 분석한 결과, 이들은 미생물 유래의 transcriptional regulator 단백질들과 높은 상동성을 나타내었다. 따라서, 이들 유전자들을 각각 *pqrR1* (*orf2*)과 *pqrR2* (*orf3*)로 명명하였다.

pqrA 유전자의 발현조절 기구의 해명을 위하여 *pqrA*, *pqrR1* 및 *pqrR2*의 각각의 유전자, 유전자 조합 및 deleted-sequences로 구성된 construct를 구축하여 *E. coli*에 형질전환한 다음, paraquat 처리 후 성장률을 조사하였다. 그 결과, *pqrR1* 및 *pqrR2* 산물은 paraquat 내성과는 직접적인 연관성이 없으며, *pqrA* 산물이 paraquat 내성에 직접 관여하는 것으로 나타났다. 또한, *pqrA* 유전자의 발현 조절에는 *pqrR1* 및 *pqrR2*가 직접 관여하지 않고 *pqrR1*의 partial sequence (2,383~2,875 bp)가 *pqrA* 유

전자의 항상적인 발현과 이를 통한 paraquat 내성 획득에 있어 enhancer sequence로서의 기능을 수행하는 것으로 추정되었다.

3) Paraquat 내성 유전자의 모델 식물로의 도입 및 내성 획득

pqrA 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector인 pGA748의 CaMV 35S promoter 하류에 연결하여 모델식물인 담배에 형질전환하였다. Southern blot 분석을 실시하여 *pqrA* 유전자의 도입을 확인한 다음, northern blot 및 immunoblot 분석을 실시하여 형질전환 담배 내에서 *pqrA* 유전자가 정상적으로 전사 및 번역되어 아미노산 서열로부터 추정되는 분자량 42 kDa의 PqrA 단백질이 membrane fraction에 축적된다는 것을 확인하였다.

형질전환 및 도입된 유전자의 정상적인 발현이 확인된 T₀ 식물체의 자가수정을 통하여 T₁ 종자를 채종하였다. T₁ 종자의 kanamycin 감수성을 확인한 결과, 모든 개체가 3:1의 분리비를 나타내어 *pqrA* 유전자가 담배의 genome에 1 copy씩 도입되었음을 확인하였다. Homozygous line을 확립하고자 T₁ 식물체의 자가수정을 통하여 T₂ 종자를 채종하여 200 µg/ml의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 파종하여 kanamycin에 의해 고사하는 개체가 하나도 없는 line을 homozygote로 선발하였다. 이와 같은 homozygous line의 선발과정을 통하여 *pqrA* 유전자가 형질전환 담배 내에서 정상적으로 유전되어 발현된다는 것을 확인하였다.

T₂ homozygous line의 형질전환 담배를 이용하여 *pqrA* 유전자의 발현량과 paraquat에 대한 내성의 획득 여부를 확인한 결과, 형질전환 식물체는 PqrA 단백질의 축적량에 따라 paraquat에 대한 내성의 획득 정도가 비례하여 증가하였으며, paraquat 처리 후 chlorophyll 함량을 기초로 비교하였을 때 형질전환하지 않은 wild-type 식물체에 비해 5배 이상의 내성 증가를 나타내었다. 또한, 식물의 잎, 줄기 및 뿌리 조직의 northern blot 및 immunoblot 분석으로부터 *pqrA* 유전자는 조직 특이적으로 발현

하는 것이 아니라 모든 조직에서 항상적으로 발현하고 있음을 확인하였으며, 광합성 기관인 잎에서와 마찬가지로 비광합성 기관인 뿌리에서도 paraquat에 대한 내성을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 *E. coli*에 paraquat 내성을 부여했던 *pqrA* 유전자는 고등식물에서도 정상적으로 발현되어 paraquat에 대한 내성을 부여한다는 것을 확인하였다. 또한, 고등식물 내에서도 미생물에서와 같이 PqrA 단백질이 membrane fraction에서 주로 축적되어 paraquat의 세포 내로의 유입의 차단 또는 유입된 paraquat의 세포 외로의 빠른 배출 작용으로 인하여 내성을 부여하는 transporter의 기능을 담당하는 것으로 추측되었다.

4) 목초 재분화계의 확립

Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 화분과 목초인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스를 선택하여 캘러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립하였다.

오차드그래스의 성숙종자 배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화의 품종간 차이를 조사한 결과, 공시품종 중 Potomac의 캘러스 생체중이 208 mg으로 가장 높았고, 식물체 재분화율도 28%로 가장 높게 조사되었다. 또한 캘러스 생체중이 무거운 품종에서 식물체 재분화 능력과 뿌리를 형성한 캘러스의 비율이 모두 높게 나타났다. 오차드그래스의 종자배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화를 위한 기본배지로는 MS 배지가 가장 효과적인 것으로 나타났다. 식물 성장조절제로는 캘러스 유도시에는 3 mg/l의 2,4-D가 가장 효과적이었고, 식물체 재분화에는 1 mg/l의 NAA와 5 mg/l의 kinetin 농도가 가장 효과적이었다.

이탈리안 라이그래스의 성숙종자 배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화의 품종간 차이를 조사한 결과, 공시품종 중 Jeanne의 캘러스 생체중이 17.6 mg으로 가장 높았고, 식물체 재분화율도 51%로 가장 높게 조사되었다. 이탈리아인 라이그래스의 종자배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화를 위한 기본배지로는 MS 배지가 가장 효과적인

것으로 나타났다. 식물 성장조절제로는 켈러스 유도시에는 2 mg/l의 2,4-D가 가장 효과적이었고, 식물체 재분화에는 1 mg/l의 NAA와 5 mg/l의 kinetin 농도가 가장 효과적이었다. 또한 배지 내에 첨가되는 탄소원의 영향을 조사한 결과, sucrose가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

5) Paraquat 내성목초의 개발

Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 *pqrA* 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector인 pIG121-Hm의 CaMV 35S promoter 하류에 도입하여 pIG-pqr2.1을 구축하였다. 또한, 형질전환 목초 내에서 *pqrA* 유전자의 발현량을 증가시키기 위하여 *pqrA* 유전자를 35S promoter에 연결한 다음, 다시 35S enhancer sequence의 tetramer를 35S promoter 상위에 도입하여 pIG-Epqr1.3을 구축하였다. 구축된 construct를 각각 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101에 도입한 다음, 오차드그래스 (cv. Potomac)와 이탈리아 라이그래스 (cv. Jeanne)의 형질전환에 이용하였다.

목초 재분화계의 확립과정에서 사용한 방법을 일부 변형하여 형질전환을 실시한 결과, pIG-pqr2.1의 경우 오차드그래스에서 7개의 식물체를, 그리고 이탈리아 라이그래스에서 25개의 hygromycin 선발된 식물체를 얻었다. 또한 pIG-Epqr1.3의 경우 오차드그래스에서 5개의 식물체를, 그리고 이탈리아 라이그래스에서 22개의 재분화된 식물체를 얻었다.

재분화된 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리한 다음, *NPTII* 유전자와 35S promoter 및 *pqrA* 유전자를 이용한 construct 별 두 조합의 PCR 분석을 실시하여, 최종적으로 pIG-pqr2.1으로 형질전환된 오차드그래스 5 개체와 이탈리아 라이그래스 20 개체를 선발하였으며, pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 오차드그래스 4 개체와 이탈리아 라이그래스 17 개체를 선발하였다.

형질전환이 확인된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 내에서 *pqrA* 유전자의

발현정도를 확인하기 위하여 northern blot 분석을 실시한 결과, *pqrA* 유전자가 형질 전환 목초 내에서 정상적으로 발현된다는 것을 확인하였으며, *pqrA* 유전자의 발현량은 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스에서 모두 개체 간의 차이가 크게 나타났다. 또한 pIG-pqr2.1로 형질전환된 목초에 비하여 pIG-*Epqr1.3*으로 형질전환된 목초에서의 *pqrA* 유전자의 발현량이 개체 간의 차이는 있지만 약 2~3배 이상 높은 것으로 나타났다.

pqrA 유전자의 도입과 발현이 확인된 형질전환 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스 (T_0)의 잎 절편을 이용하여 paraquat에 대한 내성의 획득여부를 확인한 결과, 형질전환 목초는 대조구인 wild-type에 비하여 최대 20 μ M의 paraquat 농도까지 내성의 획득을 나타내었다. 형질전환 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스 (T_0)는 homozygous line을 구축하여 식물체 수준에서 paraquat 내성유전자인 *pqrA*의 발현이 paraquat 내성에 미치는 영향을 조사하고, 이를 통하여 궁극적으로 paraquat 내성목초를 선발하기 위하여 현재 춘화처리 (vernalization) 후 T_1 종자를 채종 중에 있다.

나. 제 2 세부과제 : 「Paraquat의 토양 환경 중 동태」와 관련된 연구개발 결과

토양 중에서 제초제인 paraquat의 동태를 명확히 규명하기 위한 연구로서 토양 중에서의 흡·탈착 양상과 paraquat으로 오염된 토양으로부터 식물체로의 이행 가능성과 그 화학적 복원 방법에 대한 연구를 수행한 결과들은 다음과 같다.

Paraquat의 흡착에 미치는 경쟁 양이온의 영향은 유기물 (humic acid and fulvic acid), 토양시료 (soil A and soil B), 점토광물 (montmorillonite and kaolinite)의 순으로 크게 나타났고, 양이온으로 포화되어 있는 흡착제에 대한 paraquat의 흡착 시험에서 점토광물은 유기물이나 토양 시료에 비하여 높은 흡착율을 보여 주었으며 유기물이 흡착제로 존재할 경우, Na^+ , Ca^{2+} 또는 Cu^{2+} 이온은 paraquat의 흡착에 상당한 영향

을 미쳤다. 그리고 토양 수분함량은 paraquat의 토양에 대한 흡착에 영향을 미치지 않았다. Microwave를 이용한 토양에 결합된 paraquat의 추출에 대한 시험 결과, microwave로 추출할 경우가 환류하여 추출하는 경우보다 추출시간이 15배 단축되었고, 회수율은 약 1.2배 높은 수준으로 나타났다.

강한 산화제로 알려진 fenton 시약을 처리하면 paraquat의 분해반응은 수용액 내에서 24시간 이내에 종결되었고, 암조건에서 반응시키면 농도에 따라 51-69%, UV광이 조사되는 조건에서는 60-95%의 분해율을 보였다. 그리고 Fe^{3+} 의 농도가 높아질수록 분해율이 증가하고 paraquat의 농도와 H_2O_2 의 농도에 따른 분해율의 차이는 나타나지 않았다. Hydroxyl radical의 생성에 의해 paraquat의 분해가 이루어지는지를 조사하기 위하여 hydroxyl radical과 같은 free radical들을 제거하는 것으로 알려진 mannitol을 첨가하여 반응을 조사한 결과, fenton 시약과 UV에 의한 paraquat의 분해반응은 hydrogen peroxide에서 생성된 hydroxyl radical에 의하여 발생함을 알 수 있었다. 암조건에서 TiO_2 를 처리한 경우에는 paraquat은 13% 분해되었고, H_2O_2 를 TiO_2 와 함께 반응시킨 경우는 8%가 전환되었다. UV를 조사하는 반응 조건에서 TiO_2 만을 처리했을 경우 82%, H_2O_2 만 처리했을 경우는 9%, TiO_2 와 H_2O_2 를 함께 반응시킨 결과 90%가 분해되었다.

포장시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기는 0.15 kg a.i./10 a 수준으로 처리한 구에서는 203일, 0.29 kg a.i./10 a 수준으로 처리한 구에서는 330일로 나타났다. 실내 시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기는 2.5 mg/kg이 처리된 구에서는 231일, 5.0 mg/kg이 처리된 구에서는 433일로 나타났다. 또한 토양에 흡착된 paraquat의 물에 의한 탈착 가능성을 조사한 결과 물에 의한 진탕추출 및 환류추출은 토양으로부터의 paraquat 탈착에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 이는 토양과 강하게 결합되어 있는 paraquat이 강우에 의해 탈착되어 이동되어질 가능성이 없음을 시사한다. Paraquat의 탈착은 사용되어진 pH 범위에 관계없이 이루어지지 않았다. 이로써 토양에 흡착된 paraquat은 pH 5.6이하의 산성비에 의해 탈착될 가능성은 없는 것으로

사료된다. 또한 계면활성제의 첨가에 의해서도 탈착은 어려울 것으로 사료된다. 토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 incineration 온도의 영향을 조사한 결과 토양에 흡착된 paraquat을 효과적으로 분해시키기 위해서는 400℃ 이상의 incineration 온도에서 최소 2시간 이상의 incineration time이 요구되어지는 것으로 나타났다. 토양 중에 흡착되어 있는 paraquat은 벧짚이나 건초 등을 토양 위에서 연소시켜도 분해되지 않을 것으로 예측된다.

한편 미생물에 의한 paraquat의 분해 양상을 조사한 결과 10 ppm과 50 ppm의 paraquat이 처리된 MCY 배지에서 토양미생물인 *O. anthropi*와 paraquat 내성유전자를 포함하는 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*에 의한 paraquat의 분해 양상을 조사하였을 때 10 ppm의 paraquat이 처리된 구의 경우 최종 배양기간에 걸쳐 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*가 6.5%, *O. anthropi*가 29.4%의 paraquat을 분해하는 것으로 나타났다. 10 ppm의 paraquat이 처리된 구에서 두 균주의 생육 정도의 차이가 크지 않았다는 것을 고려할 때 10 ppm의 paraquat을 분해시킬 수 있는 능력이 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 더 크다는 것을 알 수 있다. 그리고 50 ppm의 paraquat이 처리된 구에서 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 생육 정도가 1.7배 높게 나타나 50 ppm의 paraquat을 분해시킬 수 있는 능력 및 생육 정도가 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 더 크다는 것을 알 수 있다.

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 α -cyclodextrin의 영향을 조사한 결과 비담수 토양에 첨가한 경우 71.0%의 paraquat 분해율을 나타내었고 첨가농도가 증가됨에 따라 paraquat의 분해율도 증가되는 경향을 보였다. 또한 incubation time이 길어지면 paraquat의 제거가 더욱 효과적이었으며 최대 85.6%까지 제거되는 결과를 나타내었다. α -Cyclodextrin에 의한 토양중 paraquat의 제거 가능성을 바탕으로 흡착된 paraquat의 식물체로의 이행 가능성을 SAC-WB (strong adsorption capacity measured using wheat bioassay) 조사를 통하여 규명하고자 하였다. 본 실험에 사용된 토양의 SAC-WB 값은 약 240 mg/kg이었다. α -Cyclodextrin 첨가에 의한

paraquat의 유출 현상에 의한 밀 뿌리의 성장을 조사한 결과, α -cyclodextrin의 첨가에 의해서는 거의 유출되지 않아서 밀 뿌리의 성장에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 ammonium thiosulfate (ATS)의 영향을 조사하기 위해 ATS와 paraquat의 molar ratio를 변화시켜 첨가한 결과 첨가해 준 ATS의 농도가 높을수록, 포장용수량이 많을수록, incubation time이 길어질수록, incubation temperature가 높아질수록 paraquat의 제거가 더 효과적이었으며 최대 70.7%까지 제거되는 결과를 나타내었다. 또한 SAC-WB 조사를 통하여 ATS의 첨가에 의한 흡착된 paraquat의 밀 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 사용된 토양의 SAC-WB 값에 해당하는 240 mg/kg 수준으로 처리된 paraquat의 농도에서 ATS를 첨가하였을 경우 paraquat에 의한 뿌리 성장 저해가 나타나지 않고 밀 생육이 정상적으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

또한 실내 실험의 결과를 바탕으로 실제 토양 조건에서 ATS의 paraquat 제거 효과를 확인하기 위하여 포장에서 동일한 실험을 실시한 결과 ATS에 의한 paraquat의 제거율이 실내 실험에서의 제거율보다 다소 낮기는 하였으나 어느 정도 효과를 나타내었으며 그 경향도 일치하였다. 즉, 첨가되어진 ATS의 양이 많을수록, 비닐 멀칭을 하여 반응 온도가 높을수록, 그리고 incubation time이 길어질수록 ATS에 의한 paraquat의 제거가 효과적임을 알 수 있었다. 또한 이는 실험에 적용된 두 가지 paraquat의 농도 (2 mg/kg, 10 mg/kg)에 대해서 같은 결과를 나타내었다.

현재 ATS는 비료로 사용되고 있는 물질로써 쉽게 이용할 수 있으며 비닐 멀칭을 통하여 그 효과를 증가시킬 수 있는 장점이 있어서 ATS를 paraquat으로 오염된 토양의 화학적 복원에 이용하는데 효과적일 것으로 생각된다.

제 2 절 활용에 대한 건의

본 연구에서는 paraquat 내성유전자의 발견기구의 해명을 위하여 토양으로부터 선발한 paraquat 내성 미생물인 *Ochrobactrum anthropi* JW-2의 genomic DNA로부터 paraquat 내성유전자 (*pqrA*)와 조절단백질 유전자 (*pqrR1*과 *pqrR2*)를 분리하여 그 특성을 규명한 다음, *pqrA* 유전자를 모델식물인 담배에 형질전환하여 *pqrA* 유전자의 과발현에 의한 paraquat 내성의 획득을 확인하였다. Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 화본과 목초인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스의 캘러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립한 다음, *pqrA* 유전자를 형질전환하여 paraquat에 대한 내성의 획득을 확인하였다. 또한 토양 중에서 paraquat의 흡·탈착 양상과 paraquat으로 오염된 토양으로부터 식물체로의 이행 가능성과 그 화학적 복원 방법에 대한 연구를 수행함으로써 토양 중에서 paraquat의 동태를 규명하였다.

따라서, 본 연구에서 분리한 paraquat 내성유전자와 이들 유전자의 도입을 통한 paraquat 내성식물체의 획득, 목초 형질전환 체계의 확립 및 paraquat의 토양 환경 중 동태에 관한 연구 수행과정을 통하여 축적된 기술 등을 보다 효율적으로 활용하여 효과를 극대화시키기 위한 방안 및 활용 가능성은 다음과 같다.

1. 연구결과보고서를 관련기관, 관련 종묘회사, 생명공학업계 및 관련 연구자에게 배부하여 적극적으로 홍보한다.
2. 종묘회사 및 작물육종과 관련된 생명공학 업계와의 유상 및 무상으로 기술이전을 도모하여 연구결과를 최대한 활용한다.
3. 관련분야 국내외의 학술지에 연구결과를 발표하고 각종 학술회의에 발표하여 연구내용을 검증받고 홍보한다.
4. 본 과제 수행에서 paraquat 내성 미생물의 선발과 paraquat 내성유전자의 분리에 이용한 분자생물학적 기법을 병충해 내성, 불량환경 내성 등과 같은 유용유전자

의 선발에 활용하고, 선발된 유전자는 유전 공학적 기법을 이용한 병충해 내성, 불량환경 내성을 가지는 우수 형질 식물들의 육성에 응용한다.

5. 제초제 내성유전자에 대한 특허 (원성혜, 이병현, 조진기. 파라쿠아트 내성 유전자, 이 유전자가 함유된 플라스미드 벡터 및 이를 이용한 형질전환식물체 선발 방법, 대한민국 99-28030)를 출원하였으므로 이를 이용하여 외국으로부터의 지적소유권의 사용에 대한 비용지출을 방지하는데 활용한다.
6. 현재 해외에서 생명공학적으로 육성된 품종들이 급격히 시장을 장악하고 있으며, 이러한 흐름은 자본력이 강한 다국적 기업들이 생명공학적 품종 육성에 오랜 기간, 많은 투자를 통해 얻은 결과이다. 이러한 흐름 속에서 본 과제에서 확립한 목초 형질전환 체계는 그 유용성이 국제적으로 앞서 나갈 것이며, 이를 응용하여 제초제 내성, 바이러스 저항성 등의 유용유전자를 도입하여 얻어지는 형질전환 개체들은 앞으로 농민의 기대에 부응하는 새로운 유전자를 지닌 목초 품종을 만드는 데 결정적인 역할을 할 것이다. 또한 Ti-plasmid를 이용한 단자엽 목초의 형질전환 방법을 보다 다양한 단자엽 식물체에 응용하여 유용유전자의 도입을 통한 새로운 유용작물을 창출 할 수 있다.
7. 연구수행 중 획득한 첨단기술은 국내 생명공학 관련분야 (유전자 조작 및 식물 육종) 정보의 database로 활용할 수 있으며, 본 연구에서 획득한 유전자는 생물자원으로서 중요한 가치를 지닌다.
8. 오염된 토양에 Cyclodextrin (CD)과 Ammonium thiosulfate (ATS)를 처리하여 화학적 복원을 시도한 결과 두 물질 모두 제거효과가 있는 것으로 나타났다. 두 물질 중 제거 효과나 실용성의 측면에서 현재 비료로 사용되고 있는 ATS를 이용하여 실제 토양 조건에서 paraquat의 제거 효과를 조사한 결과 ATS가 paraquat의 제거에 상당한 효과가 있음이 나타났다. 즉, 현재 ATS는 비료로 사용되고 있는 물질로써 저렴한 가격에 쉽게 이용할 수 있으며 비닐 멀칭을 통하여 그 제거효과를 증가시킬 수 있는 장점이 있어서 일반 농가에서도 ATS를 paraquat으

로 오염된 토양의 화학적 복원에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

9. 토양에 강하게 흡착되어 있는 paraquat을 추출하기 위해서는 진한 황산을 주입하여 8시간정도 환류추출하여 분석하는 것이 일반적인 분석방법이나 본 연구에서는 추출시간을 단축시키기 위하여 환류추출 방법을 대신하여 microwave를 사용한 결과 추출시간을 15배 단축할 수 있었고, 회수율도 약 1.2배 높은 수준으로 나타났다. 따라서, paraquat을 분석하는 방법에 있어서 분석 시간을 단축시킬 수 있는 방법을 제시하였다.
10. Paraquat의 토양 중 행동양상을 명확히 규명하는 일과 paraquat이 고농도로 존재하는 토양을 복원하는 것은 생태계 보전이란 차원에서 중요하다고 생각된다. 토양 중에서 paraquat의 흡·탈착 양상과 paraquat으로 오염된 토양으로부터 식물체로의 이행 가능성과 그 화학적 복원 방법에 대한 연구 수행 결과들은 paraquat으로 인해 발생할 수 있는 토양환경 관련 문제들에 대한 기초자료로 활용할 수 있다.

제 3 절 본 과제와 관련된 발표실적

가. 국내외 전문 학술지

- 1) 이석준, 김병하, 김장억 (1998) 제초제 Paraquat의 토양중 흡·탈착 특성. 농약과학회지. 2(1):70-78.
- 2) 이효신, 권용삼, 이병현, 이상현, 조진기 (1998) Orchardgrass의 종자유래 켈러스로부터 식물체 재분화. 한국초지학회지. 18(4):285-290.
- 3) 원성혜, 이병현, 김기용, 이효신, 이현정, 조진기 (1999) 알팔파의 하베축으로부터 다량의 이차 체세포배 발생과 식물체 재분화. 한국초지학회지. 19(3):273-280.
- 4) 김병하, 안미연, 김장억 (1999) Fenton 시약 및 UV광 조사에 의한 제초제 Paraquat의 분해. 농약과학회지. 3(3):20-26.

- 5) 이병현, 원성혜, 이효신, 김기용, 조진기 (1999) 알팔파 캘러스로부터 형성된 이차 체세포의 형태가 유식물 발달에 미치는 영향. 한국초지학회지. 19(4):297-302.
- 6) 이효신, 권용삼, 이병현, 원성혜, 김기용, 조진기 (2000) 오차드그래스의 현탁배양 으로부터 부정배 형성과 식물체 재분화. 한국초지학회지. 20(1):7-12.
- 7) 이병현, 원성혜, 이효신, 김기용, 조진기 (2000) 알팔파의 이차 캘러스를 이용한 *Agrobacterium*에 의한 효율적인 형질전환. 한국초지학회지. 20(1):13-18.
- 8) 원성혜, 이병현, 조진기 (2000) Perennial ryegrass의 종자 유래 캘러스로부터 식물체 재분화. 한국초지학회지. 20(1):19-24.
- 9) 원성혜, 이병현, 조진기 (2000) *Ochrobactrum anthropi* JW-2의 paraquat 내성에 관한 특성. 한국산업미생물학회지. 28(1):1-7.
- 10) Hyoshin Lee, Byung-Hyun Lee and Jinki Jo (2000) Development of transgenic Orchardgrass using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Korean Grassl. Sci. 20(2): 103-108.
- 11) 이효신, 이병현, 원성혜, 이상현, 조진기 (2000) 오차드그래스의 종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화율에 미치는 copper의 영향. 한국초지학회지. 20(4):259-264.
- 12) Sung-Hye Won, Byung-Hyun Lee, Hyo-Shin Lee, and Jinki Jo (2001) An *Ochrobactrum anthropi* gene conferring paraquat resistance to the heterologous host *Escherichia coli*. BBRC. 285:885-890.

나. 학술회의 Proceeding

- 1) 원성혜, 조진기 (1997) 토양미생물인 *Ochrobactrum anthropi* JW-2로부터 paraquat 내성 유전자의 선발, 염기서열 분석 및 식물체로의 형질전환. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 149.
- 2) Sung-Hye Won, Jinki Jo (1998) Cloning and sequencing of the paraquat

- resistance gene from *Ochrobactrum anthropi* and transformation into tobacco plants. The 8th world conference on animal production. p. 358.
- 3) Sung-Hye Won, Jinki Jo (1998) Cloning and characterization of the *pqr-1* gene of *Ochrobactrum anthropi* which confers resistance to paraquat. 한국분자생물학회 학술발표회 논문초록. pp. 206.
 - 4) 원성혜, 이병현, 이효신, 김미혜, 조진기 (1998) Paraquat 내성유전자의 확인 및 발현. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 16.
 - 5) 안미연, 김장억 (1998) Fenton 시약에 의한 제초제 Paraquat의 용액중 분해. 한국농화학회, 한국토양비료학회, 한국환경농학회 합동학술대회 논문초록. pp. 161.
 - 6) 안미연, 김종수, 김병하, 이석준, 유오중, 김장억 (1998) Microwave를 이용한 토양중 paraquat의 추출. 한국농약과학회 학술발표회 논문초록.
 - 7) 원성혜, 이병현, 김기용, 이효신, 김미혜, 정동민, 배은경, 조진기 (1999) Perennial ryegrass의 종자유래 켈러스 및 조직 절편체로부터 식물체의 재분화. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 72-73.
 - 8) 원성혜, 이병현, 김기용, 이효신, 김미혜, 이현정, 조진기 (1999) Alfalfa의 하배축 (hypocotyl)으로부터 다량의 이차 체세포배 발생과 식물체 재분화. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 73.
 - 9) 이효신, 이병현, 원성혜, 김기용, 이효신, 김미혜, 정동민, 조진기 (1999) Orchardgrass의 종자유래 켈러스로부터 부정배형성과 식물체 재분화. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 73-74.
 - 10) 이효신, 이상현, 이병현, 원성혜, 김미혜, 정동민, 배은경, 조진기 (2000) 오차드그래스 종자유래의 켈러스로부터 식물체 재분화율에 미치는 copper의 영향. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 100.
 - 11) 이효신, 이병현, 원성혜, 김미혜, 정동민, 이상현, 배은경, 조진기 (2000) *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 Orchardgrass의 형질전환. 한국초지학회 학

- 술발표회 논문초록. pp. 100.
- 12) 원성혜, 이병현, 이효신, 김미혜, 정동민, 이상현, 배은경, 조진기 (2000) *pqrA* 유전자의 식물체 도입에 의한 paraquat 내성의 증가. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 101.
 - 13) 박현주, 김장익 (2000) Chemicals-Mediated Remediation of Soil Contaminated with Herbicide Paraquat. Proceedings of the Commemorative International Symposium for the 40th Anniversary of KSACB. pp. 311.
 - 14) 강경민, 이효신, 이인애, 김미혜, 이상현, 배은경, 이명희, 조진기 (2001) 이탈리아 라이그래스의 종자유래 켈러스로부터 식물체 재분화률에 미치는 품종과 배지 조성의 영향. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. p. 84.
 - 15) 이승민, 이효신, 이인애, 김미혜, 이상현, 배은경, 이명희, 조진기 (2001) 톨 페스큐의 종자유래 켈러스로부터 식물체 재분화. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 84-85.
 - 16) 원성혜, 김기용, 이병현, 이효신, 김미혜, 장요순, 조진기 (2001) *pqrA* 유전자 도입에 의한 알팔파의 형질전환 및 재분화. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 87-88.
 - 17) 배은경, 원성혜, 이효신, 이인애, 김미혜, 이상현, 이명희, 조진기 (2001) Paraquat 내성 유전자 (*pqrA*)의 오차드그래스로의 도입. 한국초지학회 학술발표회 논문초록. pp. 89.
 - 18) 박현주, 김종수, 김장익 (2001) Ammonium Thiosulfate-mediated Remediation of Soil Contaminated with Herbicide Paraquat. 한국농약과학회 학술발표회 논문초록. pp. 64.
 - 19) 박현주, 박종우, 신현수, 김장익 (2001) Cyclodextrin Effects on the Remediation of Soil Contaminated with Herbicide Paraquat. 222th 미국화학회 (American Chemical Society National Meeting) 학술발표회 논문초록. pp. 116.

- 20) 박현주, 김종수, 권기석, 김장역 (2001) Remediation of Soil Contaminated with Herbicide Paraquat by Ammonium Thiosulfate. 222th 미국화학회 (American Chemical Society National Meeting) 학술발표회 논문초록. pp. 86.

다. 특별강연 및 강습회

라. 기타

- 1) 특허 : 원성혜, 이병현, 조진기 (1999) 파라쿠아트 내성 유전자, 이 유전자가 함유된 플라스미드 벡터 및 이를 이용한 형질전환식물체 선발 방법, 대한민국 99-28030.
- 2) 원성혜 (2000) *Ochrobactrum anthropi* JW-2로부터 paraquat 내성 유전자의 분리 및 식물체로의 도입. 경북대학교 박사학위 논문

SUMMARY

This project, "Development of forage plants tolerant to paraquat and expression regulation of the paraquat resistance gene" was designed to elucidate the expression mechanism of the paraquat resistance gene, to develop some forage plants tolerant to paraquat and to clarify behaviors of paraquat in soil environment. The results of this research are summarized as follows :

1) Results on 「Elucidation of expression mechanism of the paraquat resistance gene and development of paraquat resistant plants」

① Screening of paraquat resistance gene

A bacterium cell line, *Ochrobactrum anthropi* JW-2 tolerant to paraquat, a non-selectable herbicide was screened from a soil. *O. anthropi* JW-2 could grow about 70% level of the control (paraquat free medium) in the 100 mM paraquat concentration. It was cleared the resistance to paraquat of *O. anthropi* JW-2 was not by the increment of antioxidant enzyme activity but by another defense system because it did not show the SOD activity shift with paraquat treatment. *O. anthropi* JW-2 showed tolerance neither to redox-cycling compounds like paraquat, plumbagin or menadione nor to other agricultural use chemicals. Observing the data of absorbed paraquat level in bacterial cytosol, we deduced that the tolerance was by inhibiting to transport paraquat molecules through cell membrane selectively or active pumping out the absorbed paraquat molecules from cytosol. A 2.5 kb DNA fragment endowing paraquat resistance to *E. coli* was

screened from *O. anthropi* JW-2 genomic DNA library. As the result of DNA sequencing, it was 2,520 bp long and had a perfect ORF, *orf1* and 2 imperfect ORFs. The *orf1* (position from 643 to 1875) was consisted of 410 deduced amino acid residues and the calculated molecular mass of it was 42 kDa and it was named as *pqrA*.

② Characterization of paraquat resistance gene and analysis of the gene structure

About 53% of the total protein of the paraquat resistance gene product PqrA consisted with hydrophobic amino acid residues and it had 11 transmembrane helices. A large hydrophilic loop which was considered to be situated at the cytoplasmic site of the membrane exists between helix 5 and 6. A BLAST system search showed a high homology with drug resistance and with transporter protein. In an investigation of specificity to the active oxygen evolution drugs, *E. coli* introduced with *pqrA* did not show resistance to menadione or plumbagin at all. But they showed resistance to diquat, a pyridylum series herbicide like paraquat or to ethidium bromide, a cation molecule like paraquat. PqrA protein in the *O. anthropi* JW-2 was localized in the membrane fraction only when measured with immunoblotting. Thus, we concluded that *O. anthropi* JW-2 was tolerant to paraquat by inhibiting influx of the paraquat molecules into or by excluding them from the bacterial cytosol. It was confirmed that the gene was not induced by paraquat but was expressed constitutively when analysed by both northern and immuno blotting. *orf2* and *orf3* situated in the vicinity of *pqrA* were also cloned and sequenced with full length in this research. Both of them showed higher homologies with transcriptional regulators of the microbial origins and we named

them as *pqrR1* (*orf2*) and *pqrR2* (*orf3*), respectively. But each of them did not show paraquat resistance when introduced into *E. coli* cells. They also did not affect the expression of *pqrA*, but the partial sequence (2,383~2,875 bp) of *pqrR1* seemed to have a function of enhancer for *pqrA* expression.

③ Introduction of paraquat resistance gene to a model plant and acquirement of paraquat resistance

pqrA with CaMV 35S promoter was introduced into tobacco model plants using a binary vector, pGA748. Transformation was confirmed by Southern blot analysis. Transcription of the introduced *pqrA* also confirmed by northern blot analysis and protein accumulation was detected in the membrane fraction of the model plants by immunoblot analysis. Homozygous line (T₂) of the transformed tobacco plants with *pqrA* was produced by repeated selection. It was ascertained by analysis of kanamycin susceptibility that every one copy of *pqrA* gene was allotted in the genome of every transformed plant and the gene introduced was expressed normally in the transformed plants. Paraquat resistance of the transformed plants was increased in response to the amount of accumulated PqrA protein in which they showed the five times greater resistance to paraquat than wild-type plants did. PqrA protein was expressed constitutively in all the tissues of transformed tobacco plants and even in the roots of non-photosynthetic tissue.

④ Establishment of regeneration system in forage plants

A system for callus formation and regeneration for gramineous forage plants,

orchardgrass and Italian ryegrass was established. Among the various varieties, Potomac seeds were best for callus fresh weight yield and for regeneration. MS was the most efficient medium for callus formation and regeneration of Potomac. For callus formation, 3 mg/ℓ 2,4-D brought the best result and 1 mg/ℓ NAA and 5 mg/ℓ kinetin were best for regeneration of Potomac in the plant growth regulators test. Jeanne seeds were best for callus formation and regeneration among Italian ryegrass varieties. MS medium was also best for callus formation and regeneration in Italian ryegrass as in orchardgrass. For plant growth regulators, 2 mg/ℓ 2,4-D was best for callus formation and 1 mg/ℓ NAA and 5 mg/ℓ kinetin were better than any other combination in Italian ryegrass.

⑤ Development of paraquat resistant forage plants

A binary vector, pIG-pqr2.1 with *pqrA* gene at the downstream of CaMV 35S promoter was constructed to transform forage plants. A vector, pIG-Epqr1.3 with a tetramer of 35S enhancer sequences in the upstream of CaMV 35S + *pqrA* gene was also constructed for increased expression of *pqrA* gene in the transformed forage plants. Orchardgrass (cv. Potomac) and Italian ryegrass (cv. Jeanne) were transformed with above vectors using *Agrobacterium tumefaciens*. Transformation of the plants was confirmed by Southern blot analysis and PCR in which 5 individuals of orchardgrass and 20 individuals of Italian ryegrass transformed with pIG-pqr2.1 and, 4 individuals of orchardgrass and 17 individuals of Italian ryegrass transformed with pIG-Epqr1.3 were selected. Normal expression of *pqrA* gene of all the transformed plants was detected by northern blot analysis but there was some difference in the amount of expression level among individual transgenic

plants both in orchardgrass or in Italian ryegrass. Expression level of plants transformed with pIG-*Epqr1.3* was 2 or 3 times higher than that with pIG-*pqr2.1*.

Paraquat resistance in transformed orchardgrass (T_0) or in Italian ryegrass (T_0) was investigated using leaf segments gained from them. Results showed that segments from transgenic plants could tolerant to 20 μ M paraquat solution under light conditions while those from wild-type plants could not. Transgenic orchardgrass (Potomac, T_0) and Italian ryegrass (Jeanne, T_0) are under vernalization to get the seeds of homozygous lines for confirmation of paraquat resistance on the whole plant level.

In the near future, we will get T_1 , T_2 and T_3 generations of transgenic orchardgrass and Italian ryegrass with *pqrA* gene, will analyze the expression patterns and will test paraquat resistance on the generation and line levels and finally we will select the paraquat resistant forage plants.

2) Results on 「Behaviors of paraquat in soil environment」

To understand the adequate fate of paraquat in soil, we have investigated the aspect of adsorption and desorption of paraquat with soil and the possibility of uptake and translocation of paraquat from soil into plant, and finally the remediation of soil contaminated with paraquat.

We investigated the adsorption-desorption characteristics of herbicide paraquat on clay minerals, humic materials, and soils under the laboratory conditions. Adsorption time of paraquat on clay minerals was faster than organic materials and soils. Adsorption amount on montmorillonite, 2:1 expanding-lattice clay

mineral, was largest among the adsorbents tested. The adsorption capacity of paraquat was approximately 21% of cation exchange capacity in soil, 45.1% in kaolinite, and 80.6% in montmorillonite. Humic materials, humic acid and fulvic acid isolated from soil, adsorbed larger amount of paraquat than kaolinite and soils. Distribution of tightly bound type of paraquat was larger in clay mineral and soils but loosely bound type was larger in humic acid and fulvic acid. In oxidized soil, the adsorption amount of paraquat was decreased to 85.1~95.5% of original soils. Distribution of unbound and loosely bound type of paraquat was decreased in oxidized soil but tightly bound type was increased. The competition cations decreased paraquat adsorption on humic materials and soils but not affected on montmorillonite. No difference was observed as the kinds of cations. In cation-saturated adsorbents, the adsorption amount was decreased largely in humic materials and soils but decreased a little in montmorillonite. The tightly bound type of paraquat in all adsorbents was not desorbed by pH variation, sonication, and cation application but loosely bound type was desorbed. However, the desorption amount was different as a kind of adsorbents and desorption methods.

The potential degradation of the herbicide, paraquat by Fenton reagents (ferric ion and hydrogen peroxide) under UV light irradiation (365 nm) in an aqueous solution was investigated. When 10~500 mg/ℓ of paraquat was reacted with either ferric ion or hydrogen peroxide in the dark or under UV light, no degradation was occurred. However, the simultaneous application of both ferric ion (0.8 mM) and hydrogen peroxide (0.140 M) in paraquat solution (500 mg/ℓ) caused dramatic degradation of paraquat both in the dark (approximately 78%) and under UV light (approximately 90%). The reaction approached an equilibrium

state in 10 hours. In the dark, when 0.2~0.8 mM ferric ion was added, 20~70% paraquat of 10~500 mg/ℓ was degraded regardless of hydrogen peroxide concentrations (0.035~0.140 M), while under UV light, 95% of 10 and 100 mg/ℓ paraquat was degraded regardless of ferric ion and hydrogen peroxide concentrations. At paraquat concentrations of 200 and 500 mg/ℓ, paraquat degradation increased with increasing ferric ion concentrations in the dark. However the increase in hydrogen peroxide concentration did not affect the extent of paraquat degradation. The initial reaction rate constants (k) for paraquat degradation ranged from 0.0004 to 0.0314, and 0.0023 to 0.0367 in the dark and under UV light, respectively. The initial reaction rate constant increased in proportion to the increase in ferric ion concentration in both conditions. The half-lives of paraquat degradation ($t_{1/2}$) were 20~1,980 and 19~303 minutes in the dark and under UV light, respectively. This study indicates that Fenton reagents under UV light irradiation are more potent than in the dark in terms of herbicide paraquat degradation in an aqueous solution.

The aspect of degradation of paraquat by microorganism was studied. When *E. coli* with pBpq2.5, a DNA fragment showing paraquat resistance and *O. anthropi*, an indigenous microorganism was incubated in the medium containing 10 ppm and 50 ppm of paraquat, the degradation rate of paraquat by the transformed *E. coli* and *O. anthropi* was 6.5% and 29.4% in medium containing 10 ppm and 50 ppm of paraquat, respectively. The degradation rate of paraquat by *O. anthropi* was higher than that of paraquat by the transformed *E. coli*.

The possibility for remediation of soil contaminated with paraquat by cyclodextrin (CD) was investigated. When soil adsorbed with paraquat was incubated with CD under laboratory condition of 28°C for 2 days, the removal rate

of paraquat was 71.0%. Removal rate was increased to 85.6% with increasing amounts of CD added, incubation time and field capacity. Sterilization effect was not significantly represented. In test of SAC-WB with CD-amended soil, the SAC-WB value was 240 mg/kg. When CD was added to soil with paraquat adsorbed, paraquat was not released from soil by CD. Therefore, it seems that CD has no effect on wheat growth under different concentration of paraquat. These results suggest that CD can play an important role in the remediation of soil contaminated with paraquat.

The possibility to use ammonium thiosulfate (ATS), a fertilizer for remediation of soil contaminated with paraquat was studied. When soil adsorbed with paraquat was incubated with ATS under laboratory condition of 28°C for 2 days, the removal rate of paraquat was 34.4% in 4:1 (ATS:PQ) molar ratio. In test of SAC-WB (strong adsorption capacity-wheat bioassay) with ATS-amended soil, the SAC-WB values have no effects on plant growth. Removal rate was increased to 70.7% with increasing amended amount, incubation time, field capacity and incubation temperature. In a field experiment, the removal rate of paraquat by amendment of ATS was increased to 40.0% with vinyl mulching. ATS is currently used as a fertilizer and is, therefore, available readily at a low cost. Therefore, ATS could be used as an applicant for remediation of soil contaminated with paraquat.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	39
1-1. Objective and necessity	39
1-2. Contents and scopes	43
Chapter 2. Elucidation of expression mechanism of the paraquat resistance gene and development of paraquat resistant plants	45
2-1. Introduction	45
2-2. Materials and methods	48
1. Plant materials	48
2. Strains and vectors	48
3. Isolation of plasmid DNA	48
4. Extraction of genomic DNA	49
5. Extraction of total RNA	50
6. Protein extraction	51
7. DNA manipulations	51
8. Transformation of <i>E. coli</i>	52
9. Southern blot analysis	53
10. Northern blot analysis	54
11. PCR amplification	54
12. DNA sequencing and analysis	55
13. Antibody preparation	57
14. Immunoblot analysis	58
15. The others	58

2-3. Elucidation of paraquat resistance gene structure	59
1. Isolation of the paraquat resistance bacteria, <i>Ochrobactrum anthropi</i> JW-2 from soil	59
2. Screening of a paraquat resistance DNA fragment from <i>Ochrobactrum</i> <i>anthropi</i> JW-2	63
3. DNA sequencing of the paraquat resistance DNA fragment, pBpq2.5	67
4. Confirmation of resistance to paraquat and other drugs of the DNA fragment	84
5. Preparation of PqrA antibody	92
6. Characterization of <i>pqrA</i>	96
7. Cloning of <i>orf2</i> and <i>orf3</i> , and DNA sequencing	99
8. Confirmation of the region showing paraquat resistance and elucidation of the gene structure	109
2-4. Development of paraquat resistant forage plants	113
1. Introduction <i>pqrA</i> to tobacco plants and confirmation of paraquat resistance	113
2. Regeneration system of some forage plants	131
3. Development of paraquat resistant forage plants	141
2-5. Conclusion	164
1. Screening of a paraquat resistance gene	164
2. Characteristics of paraquat resistant DNA fragment and elucidation of its structure	165
3. Introduction of paraquat resistance gene to model plants and the paraquat resistance of the plants	167
4. Establishment of regeneration system for some forage plants	168
5. Development of paraquat resistant forage plants	169

Chapter 3. Behaviors of paraquat in soil environment	171
3-1. Introduction	171
3-2. Adsorption pattern of paraquat	174
1. Introduction	174
2. Materials and methods	175
3. Results and discussion	180
3-3. Desorption pattern of paraquat	194
1. Introduction	194
2. Materials and methods	194
3. Results and discussion	199
3-4. Uptake and translocation of paraquat into plant	212
1. Introduction	212
2. Materials and methods	212
3. Results and discussion	215
3-5. Chemical remediation of soil contaminated with paraquat	224
1. Introduction	224
2. Materials and methods	224
3. Results and discussion	228
3-6. Conclusion	235
Chapter 4. General conclusions	239
References	250

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	25
CONTENTS	33
목 차	36
제 1 장 서 론	39
제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성	39
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	43
제 2 장 Paraquat 내성유전자의 발현기구 해명 및 paraquat 내성목초 개발	45
제 1 절 서설	45
제 2 절 재료 및 방법	48
1. 재료식물	48
2. 균주 및 vector	48
3. Plasmid DNA의 분리	48
4. Genomic DNA의 분리	49
5. Total RNA의 분리	50
6. 단백질의 분리	51
7. DNA 조작	51
8. 대장균의 형질전환	52
9. Southern blot 분석	53

10. Northern blot 분석	54
11. PCR 증폭	54
12. DNA 염기서열 결정 및 분석	55
13. 항체의 제작	57
14. Immunoblot 분석	58
15. 기타	58
제 3 절 Paraquat 내성유전자 발현조절기구의 해명	59
1. 토양으로부터 paraquat 내성균인 <i>Ochrobactrum anthropi</i> JW-2의 분리	59
2. <i>Ochrobactrum anthropi</i> JW-2로부터 paraquat 내성유전자의 분리	63
3. Paraquat 내성유전자, pBpq2.5의 DNA 염기서열 결정 및 분석	67
4. Paraquat 및 다른 약제에 대한 내성의 확인	84
5. PqrA의 항체 제작	92
6. <i>pqrA</i> 유전자의 특성 해명	96
7. <i>orf2</i> 및 <i>orf3</i> 의 클로닝 및 DNA 염기서열 결정	99
8. Paraquat 내성유전자 영역의 확인 및 발현조절 기구	109
제 4 절 Paraquat 내성목초의 개발	113
1. <i>pqrA</i> 유전자의 담배로의 도입 및 내성 확인	113
2. 목초 재분화계의 확립	131
3. Paraquat 내성목초의 개발	141
제 5 절 결론	164
1. Paraquat 내성유전자의 선발	164
2. Paraquat 내성유전자의 특성 및 발현기구 해명	165
3. Paraquat 내성유전자의 모델 식물로의 도입 및 내성 획득	167
4. 목초 재분화계의 확립	168
5. Paraquat 내성목초의 개발	169

제 3 장 Paraquat의 토양 환경 중 동태	171
제 1 절 서설	171
제 2 절 Paraquat의 흡착양상	174
1. 서론	174
2. 재료 및 방법	175
3. 연구수행 내용 및 결과	180
제 3 절 Paraquat의 탈착양상	194
1. 서론	194
2. 재료 및 방법	194
3. 연구수행 내용 및 결과	199
제 4 절 Paraquat의 식물체로의 이행	212
1. 서론	212
2. 재료 및 방법	212
3. 연구수행 내용 및 결과	215
제 5 절 Paraquat으로 오염된 토양의 화학적 복원	224
1. 서론	224
2. 재료 및 방법	224
3. 연구수행 내용 및 결과	228
제 6 절 결론	235
제 4 장 종합 결론	239
참고문헌	250

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적 및 중요성

1. 농업은 잡초와의 전쟁

농업의 역사는 잡초와의 싸움이라고 해도 과언이 아니다. 그러므로 잡초방제가 잘 될수록 농업생산력이 향상하고 있음을 농업의 역사에서 알 수가 있다. 기원전 1000년까지는 쟁기에 의하여 잡초가 제거되었으므로 농부 한 사람이 두 사람의 식량분 밖에 생산할 수 없었으나, 1920년 트랙터의 출현으로 잡초의 방제가 한결 쉬워지면서 8명분의 식량을 생산 할 수 있게 되었으며, 1947년경부터 처음으로 제초제가 생산보급되기 시작하면서 생산성이 급격히 증가하여 농부 한 사람이 16명분의 식량을 생산할 수 있게 되었다. 그 이후, 다양한 선택성을 가진 제초제의 개발과 다른 농업기술의 발달에 힘입어 미국에서는 1980년대에는 농부 한 사람이 38명분의 식량을 생산 할 수 있게 되었다. 이와 같이 제초제가 발달할수록 생산성이 급격히 증가함을 알 수 있으며 잡초는 농업생산을 떨어뜨리는 가장 큰 요인이 된다. 우르과이라운드 합의 이후 식량 경쟁이 내외적으로 더욱 치열해져가고 있다. 이에 대처하기 위해서는 안정성을 가진 고수익성의 농업을 실시하고 농작물 생산비의 절감 및 고품질 농산물의 생산이 필수적이며, 이를 극복해 나가는데 있어 잡초 방제의 효율성 및 안전성이 중요한 요소가 되고 있다.

2. 비선택성 제초제 내성유전자를 도입한 목초개발의 효과

제초제에는 다양한 선택성이 있다. 단자엽 식물에 효과가 있는 제초제가 있는가 하면, 광엽 잡초에 효과가 있는 제초제도 있고 또한, 모든 식물을 한꺼번에 살초하

는 제초제도 있다. 선택성의 제초제를 사용할 경우, 작물을 보호한다는 이점은 있지만 작물과 비슷한 생리적 특성을 가진 잡초는 제거 할 수 없게 된다. 반대로 비선택성의 제초제를 사용하면 모든 잡초를 제거 할 수는 있지만 작물도 함께 피해를 입게 된다. 미국의 농경지 면적은 약 6억 ha로 1971년도의 잡초에 의한 피해가 약 \$ 25억 이었다는 보고가 있다. 우리나라의 농경지 면적은 약 200만 ha이고 ha당 피해액 (減收, 除草人件費, 除草濟貸 包含)을 100,000원으로 보면 연간 2,000억원이 손실될 것으로 예상된다. 목초지의 경우, 잡초의 침입으로 생산성이 떨어지게 되면 초지의 갱신을 해야한다. 그러나 만약 제초제 내성을 가지는 유전자를 분리하여 목초에 도입함으로써 제초제 내성 형질전환 식물을 개발한다면 초지의 갱신없이도 질이 좋고 생산성이 높은 목초지를 연속적으로 유지 할 수 있다.

3. Paraquat이란 어떤 제초제인가?

Paraquat은 비홀몬형의 접촉형, 비선택성 제초제로서 1958년 미국 ICI사가 그라목손이라는 상품명으로 개발하였으며, 개발된지 오래되어 이미 물질특허의 기간이 지났으므로 국내에서 자유롭게 생산 판매되고 있다. 우리나라에는 1970년에 들어와 24.5%의 액제로써 과수원잡초제거용으로 사용되어 왔으며, 어린잎에서부터 성숙한 잎에 이르기까지 경엽처리로 신속히 체내에 흡수되어 살초시키는 속효성 제초제이다. 이 제초제의 작용기작은 paraquat이 광합성의 명반응계에서 전자를 받아 환원이 되고, 환원된 paraquat이 세포 내의 전자전달계를 이용하여 대기중의 산소 (三重項酸素, O_2^{-3})를 환원시켜 superoxide (O_2^-)를 만들며, 이때 과다하게 생성된 superoxide를 처리하지 못하는 세포는 사멸하고 마침내 개체도 죽게되므로 살초 효과가 나타나게 된다.

4. Paraquat의 환경오염 문제는 심각한가?

Paraquat을 포함한 모든 제초제와 농약이 사용 후에 환경오염이라는 문제를 야기하게 된다. 그러므로 가급적이면 농약류를 사용하지 않거나 환경친화성 농약 또는 생물농약을 사용함으로써 환경문제를 적게 일으키는 것이 가장 이상적이라 할 수 있다. 그러나 적절한 생물농약이 개발되지 않은 상황 하에서 농약사용의 중단은 곡물생산량의 급격한 감소라는 새로운 문제를 야기하게 될 것이다. 그러므로 여러 가지의 농약들 중에서 가장 환경에 영향을 덜 미치면서 효과가 높고 경제성을 가진 농약을 엄밀하게 선택해야할 필요성이 있다. Paraquat은 모든 생물세포에 대하여 독성을 가지지만 살포된 paraquat은 태양에 노출되면 자외선에 의하여 쉽게 분해되며, 토양에 접촉된 것은 접촉과 동시에 토양에 강하게 흡착되므로 하천을 오염시킬 염려는 거의 없다. 한 보고서에 의하면 12년간 paraquat을 사용한 토양으로부터 추출한 추출물에서 paraquat이 거의 검출되지 않았다고 한다. 그러므로 많은 비선택성 제초제들 중에서 paraquat은 환경 친화적인 경향의 제초제라고 볼 수 있다. 본 연구의 제2세부과제에서 paraquat이 논토양에서 토양에 흡착, 탈착 및 미생물 또는 UV에 의한 분해기작을 밝혀냄으로써 사용된 paraquat이 가급적 환경을 덜 오염시키는 문제에 대한 해답을 주게 될 것이다.

5. Paraquat 내성목초 재배시에는 제초제 사용량을 현격히 줄일 수 있다.

Paraquat 내성유전자를 가진 목초를 재배할 경우, paraquat을 사용하더라도 목초에는 해가 없을 것이라는 안도감 때문에 필요 이상의 paraquat을 사용함으로써 말미암아 환경오염이 더 가중되지 않을까 하는 우려가 있을 수 있다. 그러나 실제로는 그렇지 않다. Paraquat 내성이 없는 목초를 초지에서 제초하기 위해서는 여러 가지의 선택성 제초제를 수 회에 걸쳐 사용해야하지만, paraquat 내성유전자를 가진 목초를 재배하는 초지에서는 적절한 시기에 단 한 번의 paraquat 사용으로 제초

가 가능하기 때문에 제초제 사용 총량을 월등하게 줄일 수 있다.

6. Paraquat의 경제성

Paraquat은 개발된지 오래되어 이미 물질특허의 기간이 지났으므로 국내에서 자유롭게 생산판매되고 있다. Paraquat과 같은 비선택성 제초제 중에는 근사미 (Glyphosate)와 Basta가 있으며, 근사미는 미국의 몬산토社에서 특허권을 가지고 있으며 Basta는 일본의 메이지제약에서 특허권을 가지고 있으므로 이들 두 제초제는 paraquat에 비하여 월등하게 비싸다.

7. Paraquat 내성유전자의 분리에 성공

본 연구책임자의 연구실에서는 3년 전부터 미생물로부터 paraquat 내성유전자를 분리하기 위한 연구에 착수하여 많은 시행착오 끝에 비로소 이 유전자의 분리에 성공하였다. 우리나라의 많은 연구실에서 비선택성 제초제인 bialaphos에 대하여 내성을 가지는 유전자인 *bar* gene과 glyphosate에 대하여 내성을 가지는 glyphosate 내성유전자에 대하여 상당한 연구가 진행되고 있으며 상당한 성과가 있는 것이 사실이다. 그러나 glyphosate 내성유전자는 미국의 몬산토社에서 특허권을 가지고 있으며, 다른 제초제 내성유전자인 *bar* gene은 일본의 메이지제약에서 특허권을 보유하고 있으므로 이들 유전자로 형질전환 식물을 만든다고 하더라도 특허료를 지불하지 않고는 사용할 수가 없다. Paraquat 내성유전자는 아직 어느나라에서도 특허를 출원한 바 없으며, 본 연구책임자의 연구실에서 처음 분리하였으므로 이 유전자를 이용한 형질전환 작물의 개발은 많은 경제성을 지닌 것으로 판단된다.

제2절 연구개발의 내용 및 범위

제 1 세부과제 : Paraquat 내성유전자의 발현기구 해명 및 paraquat 내성목초 개발

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기 분리한 paraquat 내성 유전자의 확인 및 구조해명 2. 목초 재분화계 및 형질전환계 확립 	<ol style="list-style-type: none"> 1. DNA sequencing, 타 유전자들과의 homology 비교, 유전자의 구조해명 2. 국내 재배 품종 재분화계 확립, <i>Agrobacterium</i>을 이용한 형질전환계 확립
2차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. Paraquat 내성유전자 영역의 확정 2. Paraquat 내성유전자 산물의 특성해명 3. Paraquat 내성유전자의 식물체 도입 및 검정 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 영역확정을 위한 deletion clone의 작성, Paraquat의 농도별 처리, Paraquat 내성유전자 영역의 확정 2. 단백질의 특성해명, 단백질과 paraquat과의 interaction 확인 3. Paraquat 내성유전자의 도입, 온실에서서의 순화, 형질전환 확인
3차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. Original 세균에서 paraquat 내성 관련 유전자의 선발 2. 제초제 저항성식물의 유전양식 조사 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Southern hybridization에 의한 paraquat 내성유전자의 염색체 상에서의 확인, Genomic DNA library작성, Paraquat 내성유전자의 선발, 조절 영역의 특성해명 2. 형질전환체의 자가수정 및 kanamycin 내성 test, Northern blot에 의한 발현량 조사, 발현량에 따른 내성관련 조사
4차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. Paraquat 내성유전자 전사조절 유전자의 분리 2. Paraquat 내성식물의 생육 특성조사 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Paraquat 내성유전자 상류와 하류영역의 sequencing, Gene mapping, 전사조절 유전자의 분리, Promoter의 탐색, 제어인자의 정제, 항체작성 2. 종자로부터 도입 유전자의 우열성 조사, 생육시기별 paraquat 내성조사, homozygote 식물의 육성, 형질전환 식물의 종자 확보

제 2 세부과제 : Paraquat의 토양 환경 중 동태

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도	Paraquat의 흡착양상규명	① 토성에 따른 흡착양상, ② 점토광물 및 유기물에 의한 흡착양상, ③ 수분함량에 따른 흡착양상, ④ 온도, pH 및 경쟁 양이온에 따른 흡착양상
2차년도	Paraquat의 탈착양상규명	① 물, pH, 계면활성제에 의한 paraquat의 탈착양상 규명 ② 전기 영동에 의한 paraquat의 탈착양상 규명 ③ Paraquat의 토양 중 분해 반감기 규명 ④ Incineration에 의한 토양 중 paraquat의 분해 소실양상 규명 ⑤ α -Cyclodextrin, sulfur에 의한 토양 중 paraquat의 분해양상 규명 ⑥ 미생물에 의한 paraquat의 분해규명
3차년도	Paraquat의 미생물에 의한 분해 규명	① α -Cyclodextrin에 의한 분해 및 분해과정의 규명 ② Sulfur에 의한 분해 및 분해과정을 규명 ③ Oxalic acid에 의한 분해 및 분해과정의 규명 ④ 미생물에 의한 분해 및 분해과정의 규명 ⑤ 광에 의한 분해 및 분해과정의 규명
4차년도	토양에 흡착된 paraquat의 remediation	① Cyclodextrin의 형태별 remediation 기작 연구 ② ATS에 의한 remediation 기작 연구 ③ Microcosm에 의한 remediation 기작 연구 ④ Oxidative catalysts에 의한 remediation 기작 연구

제 2 장 Paraquat 내성유전자의 발현기구 해명 및 paraquat 내성목초 개발

제1절 서 설

초지에 있어 잡초에 의한 피해로부터 생산성을 높게 유지하기 위하여 일반적으로 우리나라에서는 적어도 5년마다 한 번씩 초지를 갱신한다. 현재 우리나라의 초지 총면적은 약 50,000 ha이며, 이의 1/5인 10,000 ha를 갱신한다고 할때 ha 당 초지 조성비를 200만원으로 계산하면 초지갱신에만 연간 약 200억원이 소요되며, 초지갱신 직전까지의 잡초에 의한 목초의 감수까지를 고려하면 연간 250억원 이상이 소요될 것이다. 장차 만약 초지가 대형화되면 초지갱신 비용은 더욱 증가될 것으로 예상된다. 또한 미국의 농경지 총 면적은 약 6억 ha로 1971년도의 잡초에 의한 피해가 약 \$ 25억 이었다는 보고가 있으며, 우리나라의 농경지 총 면적은 약 200만 ha이고 ha당 피해액 (減收, 除草人件費, 除草濟貨 包含)을 100,000원으로 보면 연간 2,000억원 이상이 손실될 것으로 예상된다.

또한, 유전공학 연구조합의 조사에 의하면 세계 형질전환 식물의 종자 시장은 연간 약 1000억불에 달할 것으로 추정되므로 제초제 내성유전자의 개발과 형질전환 목초의 개발은 타 식물과 타 유전자에도 파급되므로 초지 개량에 소요되는 경비 이외의 부가적인 효과도 충분히 예상된다. 문헌에 의하면 1993년까지 포장실험이 허가된 형질전환 식물은 모두 794 건에 달하며 이들 중 각종 제초제 내성의 형질전환 식물에 대한 것이 462 건으로서 압도적으로 많다. 나라별로는 캐나다가 가장 많고 다음이 미국과 유럽 순이며 1992년 이후에 급격히 증가하고 있는 추세이다. 아시아권에서는 1991년에 일본에서 1건의 보고가 있을 따름이나 일본의 경우에

는 연구실 수준에서는 상당히 많은 연구결과를 보유하고 있는 것으로 전해진다. 미국에서는 일본과 한국을 겨냥하여 glyphosate 내성유전자를 도입한 작물을 개발하여 온실에서의 확인실험이 이미 끝난 상황에 있다고 하는데 만약 우리가 이 종자를 도입한다면 로알티가 부가된 형질전환 종자를 구입하는 대금을 치러야 할 뿐 아니라, 잡초를 제거하기 위해서는 또한 반드시 미국의 몬산토社가 특허권을 보유하고 있는 glyphosate (근사미) 만을 사용해야하므로 이중의 부담을 안게 될 것이다.

제초제를 이용하여 초지로부터 잡초를 제거하는 가장 좋은 방법은 목초에 제초제 내성유전자를 도입한 후, 비선택성 제초제를 사용함으로써 목초 이외의 모든 잡초들을 제거하는 것이다. 비선택성 제초제의 내성유전자를 도입하는 기술은, 어떤 생물세포로부터 제초제 내성유전자를 분리하는 기술과, 분리한 제초제 내성유전자를 적당한 vector에 실어서 식물세포 내에 도입하는 기술로 나눌 수 있다. 특정 유전자를 분리해 내는 기술이나 이 유전자를 식물세포로 도입하는 기술은 이론적으로는 어렵지 않으며, 실제로 우리나라에서도 실험실 수준에서 상당히 많이 사용하고 있는 기술들이다. 그러나 이 기술들을 이용하여 실생활에 필요한 생물세포들을 만드는 단계까지는 아직 이르지 못하고 있는 실정이다. 제초제 내성식물과 관련하여 glyphosate 내성유전자는 미국의 몬산토社에서 특허권을 가지고 있으며, basta 내성유전자 (Biala-phos resistant gene)의 경우는 일본 메이지제약에서 특허권을 보유하고 있다. 그러므로 우리가 glyphosate 또는 basta 이외의 특정 제초제 내성을 가지는 유전자를 분리하여 목초에 도입함으로써 제초제 내성 형질전환 식물을 개발한다면 초지의 갱신없이도 질이 좋고 생산성이 높은 목초지를 연속적으로 유지할 수 있을 것이다. 이 경우 우리는 반드시 우리의 기술로 외국에서 분리한 것과는 상관없이 효과가 좋은 비선택성 제초제 내성유전자를 분리하여 주요 작물에 도입하여 사용하여야 한다.

Paraquat은 비호르몬형의 접촉형, 비선택성 제초제로서 1958년 미국 ICI사가 그라목손이라는 상품으로 개발하였으며, 개발된지 오래되어 이미 물질특허의 기간이 지났으므로 국내에서 자유롭게 생산 판매되고 있다. 우리나라에는 1970년에 들어와 24.5%의 액제로써 과수원잡초제거용으로 사용되어 왔으며, 어린잎에서부터 성숙한 잎에 이르기까지 경엽처리로 신속히 체내에 흡수되어 살초시키는 속효성 제초제이다. 이 제초제의 작용기작은 paraquat이 광합성의 명반응계에서 전자를 받아 환원이 되고, 환원된 paraquat이 세포 내의 전자전달계를 이용하여 대기중의 산소(三重項酸素, O_2^{-3})를 환원시켜 superoxide (O_2^-)를 만들며, 이때 과다하게 생성된 superoxide를 처리하지 못하는 세포는 사멸하고 마침내 개체도 죽게되므로 살초 효과가 나타나게 된다.

본 연구에서는 paraquat 내성유전자의 발현기구의 해명을 위하여 토양으로부터 선발한 paraquat 내성 미생물인 *Ochrobactrum anthropi* JW-2의 genomic DNA로부터 paraquat 내성유전자 (*pqrA*)와 조절단백질 유전자 (*pqrR1*과 *pqrR2*)를 분리하여 그 특성을 규명하였다. Paraquat 내성유전자 (*pqrA*)를 모델식물인 담배에 형질전환한 다음, *pqrA* 유전자의 과발현에 의한 paraquat 내성의 획득을 확인하였다. Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 화본과 목초인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스의 캘러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립한 다음, *pqrA* 유전자를 형질전환하여 paraquat에 대한 내성의 획득을 확인하였다.

위와 같은 paraquat 내성유전자의 발현기구 해명 및 paraquat 내성목초 개발에 관한 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

제2절 재료 및 방법

1. 재료식물

본 실험의 재료식물로 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun), 오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.) 및 이탈리아안 라이그래스 (*Lolium multiflorum* Lam.)를 광도 12,000 lux, 습도 70%, 온도 24-28°C/16시간의 광조건과 20-22°C/8시간의 암조건으로 growth chamber에서 생육시켰다.

2. 균주 및 vector

본 연구에서 사용한 균주 및 vector는 다음과 같다. Plasmid vector를 이용한 subcloning과 증폭을 위한 숙주균으로 *E. coli* JM109와 DH5 α 를 이용하였다. PCR 산물의 subcloning을 위하여 pGEM-T easy vector를 이용하였으며, DNA 단편의 subcloning과 DNA 염기서열의 결정을 위하여 pBluescript II SK+ vector를 이용하였다. 단백질 과발현을 위한 발현 vector로는 pGEX-4T-1과 pET28b를 사용하였고, 단백질 과발현을 위한 숙주균으로는 *E. coli* JM109와 λ BL21(DE3) LysS를 사용하였다. Binary vector로는 pGA748과 pIG121-Hm을 이용하였으며, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 또는 EHA101에 형질전환하여 식물체 형질전환에 이용하였다.

3. Plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA는 Birnboim과 Dolly (1979)의 alkaline lysis 법으로 분리하였다. 배양액을 원심분리하여 대장균 세포만을 회수한 다음, solution-I 에 현탁하였다. 2 volume의 solution-II을 첨가하고 다시 1.5 volume의 solution-III을 첨가하여 혼합한

다음, 얼음에 5분간 정치하였다. 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 회수한 다음, phenol/chloroform/isoamylalcohol (phe/chl/iso; 25:24:1; v/v/v) 추출하였다. 2 volume의 ethanol을 첨가하여 -80℃에서 15분간 정치한 다음 원심분리하여 DNA pellet을 회수하였다. 70% ethanol 세정 후, 진공건조하여 멸균수에 녹였다. DNA sequencing을 위한 plasmid DNA는 Wizard Miniprep kit (Promega, USA)를 사용하여 분리하였다.

4. Genomic DNA의 분리

Ochrobactrum anthropi JW-2로부터 genomic DNA의 분리는 Marmur (1961)에 의한 방법을 변형하여 실시하였다. LB 배지에서 하룻밤 배양한 배양액 100 ml를 원심분리하여 균체를 회수하여 TE buffer (pH 8.0)에 현탁한 후, lysozyme (10 mg/ml)을 첨가하여 37℃에서 40분간 배양하여 용균시켰다. 최종농도가 1%가 되도록 SDS를 첨가하고 다시 37℃에서 1시간 더 배양한 후, CTAB (cethyl trimethyl ammonium bromide)와 NaCl을 각각 최종농도 1%와 0.1 M이 되게 첨가하여 65℃에서 10분간 처리하였다. 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하고, 이를 chloroform/isoamylalcohol (chl/iso; 24:1; v/v)로 1회, chloroform으로 2회 추출하였다. 회수된 DNA는 CsCl 농도구배 ($d=1.53 \text{ g/ml}$)로 초원심분리하여 (Beckman, TL-100) DNA band를 분리하였다. 분리한 genomic DNA는 water saturated n-butanol로 수 회 세정하여 ethidium bromide를 제거하고, 2 volume의 100% 에탄올로 침전시킨 다음, 70% ethanol로 세정하여 TE buffer (pH 8.0)에 녹였다.

식물조직으로부터 genomic DNA의 분리는 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)를 이용한 Murray와 Thompson (1980)의 방법으로 분리하였다. 식물조직 5 g을 액체질소를 이용하여 유발과 유봉으로 파쇄한 다음, 5 ml의 2×CTAB buffer (2% CTAB; 0.1 M Tris, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 1% PVP)를 넣고, 55℃의 항온수조에서 10

분간 정치하였다. Chloroform/isoamylalcohol (chl/iso; 24:1; v/v)을 첨가하여 실온에서 30분간 교반한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액을 chl/iso로 한번 더 추출한 다음 1/10 volume의 10×CTAB buffer (10% CTAB; 0.7 M NaCl)와 1 volume의 침전용 buffer (1% CTAB; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA)를 첨가하였다. 30분간 교반한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하고, 1 M NaCl-TE buffer (1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)에 녹인 다음 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하여 70% ethanol로 2회 세정하고, 진공 건조한 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2.5 mM EDTA)에 녹여 RNase A를 처리하였다.

5. Total RNA의 분리

O. anthropi JW-2로부터 total RNA를 분리하기 위하여 하룻밤 배양한 배양액 2 ml를 100 ml의 LB 배지에 접종하여 28°C에서 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하였다. 균체를 TE buffer에 현탁하여 세정하고 다시 균을 lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5; 100 mM EDTA; 2% SDS; 0.25% Sarkosyl; 0.2% Triton X-100)에 녹인 다음, 동량의 glass beads (100 μm, Sigma)와 2.5 volume의 phenol/chloroform (1:1)을 넣어 vortexing하고 원심분리하여 상층액을 회수하였다. Phenol/chloroform 추출과정을 2회 더 반복하고 에탄올 침전, 70% 에탄올 세정한 다음, DEPC 처리한 멸균수에 녹였다. 최종농도 4 M이 되도록 LiCl를 첨가하여 얼음에서 30분간 정치한 후, 원심분리하여 RNA pellet을 회수한 다음, 멸균수에 녹여 phenol/chloroform 추출, 에탄올 침전과정을 거쳐 70% 에탄올로 세정한 다음 최종적으로 DEPC 처리한 멸균수에 녹였다.

식물조직으로부터 total RNA의 분리는 guanidine thiocyanate (GTC) 법으로 실시

하였다. 식물조직 1 g을 액체질소를 이용하여 유발과 유봉으로 파쇄한 다음, 4 ml의 GTC extraction buffer (4.2 M GTC; 0.5% N-Laurylsarcosyl; 25 mM Na-citrate; 0.1% antiform A emulsion)와 50 μ l의 β -mercaptoethanol 및 400 μ l의 3 M Na-acetate (pH 5.2)를 첨가하여 완전히 혼합하였다. 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거하고, phe/chl/iso 추출을 5회 이상 실시하였다. 상층을 회수하여 2 volume의 ethanol을 첨가하여 혼합한 다음, 15,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 침전물을 1 ml의 멸균수에 완전히 녹인 다음, 250 μ l의 10 M LiCl를 첨가하여 얼음에 30분간 정치하였다. 15,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수한 다음 70% ethanol로 2회 세정하고, 실온에서 건조한 후 DEPC 처리한 멸균수에 녹였다.

6. 단백질의 분리

식물의 잎 1 g을 액체질소를 이용하여 유발과 유봉으로 파쇄한 다음, 1 ml의 추출용 buffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0; 10 mM EDTA; 0.1% Triton X-100; 0.1% sarkosyl; 10mM β -mercaptoethanol)를 첨가하였다. 4°C에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, 상층액을 회수하여 -20°C에 보관하였다. 단백질의 농도는 standard protein으로 BSA를 이용한 Bradford 법 (1976)을 이용하여, 595 nm에서의 흡광도의 값으로 결정하였다.

7. DNA 조작

DNA의 절단은 제한효소를 첨가한 후, 최종 volume이 10-20 μ l가 되게 조절하여 각각의 효소의 적정온도에서 1 시간 이상 반응시켰다. 두 가지 이상의 제한효소 처리는 먼저 낮은 염 농도에서 활성이 있는 효소를 처리한 다음, phenol 추출 및 ethanol

침전을 통하여 DNA를 회수한 후, 높은 염 농도에서 활성이 있는 효소를 처리하였다. 반응산물은 0.8-1.2% agarose gel에서 TBE buffer (89 mM Tris-borate; 2 mM EDTA)를 사용하여 전기영동하였으며, 이때 running buffer에 ethidium bromide를 최종농도 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가하여 영동한 후, UV transilluminator 상에서 확인하였다.

Gel로부터 DNA의 회수를 위하여, 목적으로 하는 DNA band를 잘라낸 다음, Elu-Quik kit (Schleicher & Schuell, USA)를 사용하여 정제하였으며, 제조회사의 protocol에 따라 실시하였다.

DNA ligation은 vector와 insert DNA의 molar ratio를 1:2~3으로 하여 T4 DNA ligase를 이용하여 실시하였으며, 반응온도는 sticky end의 경우는 16°C에서, blunt end의 경우는 22°C에서 각각 12시간 이상 반응시켰다. DNA의 조작을 위한 기타 DNA modifying enzyme의 처리는 제조회사의 protocol에 따라 실시하였다.

8. 대장균의 형질전환

가. 대장균 competent cell의 준비

대장균 세포의 single colony를 3 ml의 LB 배지에 접종한 다음, 37°C에서 8시간 이상 진탕배양하였다. 배양액 400 μl 를 다시 40 ml의 LB 배지에 접종한 다음, 37°C에서 A_{660} 이 0.4가 될 때까지 배양하였다. 배양액을 얼음에 10분간 정치한 후, 3,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 20 ml의 ice-cold 50 mM CaCl_2 용액에 균체를 현탁하여 얼음에 30분간 정치한 다음, 원심분리하여 균체를 회수하고 4 ml의 stock buffer (50 mM CaCl_2 ; 15% glycerol)에 현탁하였다. 현탁액을 Eppendorf tube에 100 μl 씩 분주한 다음, 액체질소에 급속동결하여 -80°C에 보관하였다.

나. 형질전환

DNA sample (50-100 ng)을 50-100 μl 의 대장균 competent cell에 첨가하여 혼합한 다음, 얼음에 30분간 정치하였다. 42°C에서 90초간 열처리 한 다음, 다시 얼음에 5분간 정치하였다. 1 ml의 LB 배지를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양한 후, 50-100 μl 를 취하여 선발표지로서 항생제가 첨가된 LB agar plate에 도말하여 37°C에서 colony의 형성을 유도하였다.

9. Southern blot 분석

Genomic DNA를 각각의 제한효소로 절단한 다음, 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel 상의 DNA를 nylon membrane으로 transfer 하기 위하여 vacuum transfer 장치에 멸균수로 적신 blotting paper와 membrane을 놓고, gel을 얹은 다음 기포를 제거하였다. 진공상태에서 gel 위에 depurination 용액 (0.25 M HCl)으로 10분간, transfer 용액 (0.4 NaOH; 0.6 M NaCl)으로 30분간 처리한 다음, membrane을 회수하여 2×SSC (0.3 M NaCl; 30 mM sodium citrate)에 1분간 세정하고 UV-crosslinker (UVP CL-1000, USA)를 이용하여 fixation을 실시하였다.

Probe DNA의 방사능 표식을 위하여 Multiprime Labeling kit (Amersham, RPN1601)를 이용하였다. 10 μl (25 ng)의 template DNA를 5분간 끓인 후, 다시 얼음에 5분간 정치하였다. 5 μl 의 5×labeling buffer, 2.5 μl 의 random primer/BSA 용액, 26.5 μl 의 nuclease-free water, 1 μl 의 Klenow enzyme 및 5 μl 의 [α -³²P] dCTP를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. Hybridization을 위하여 membrane 당 10-15 μl 의 probe DNA를 5분간 끓여 변성시킨 다음, 얼음에 냉각시켜 첨가하였다.

Membrane에 high stringency hybridization 용액 (50% formamide; 5×SSC; 5×Denhardt's solution; 50 mM Na-phosphate, pH 6.5; 0.1% SDS; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured

salmon sperm DNA) 또는 low stringency hybridization 용액 (20% formamide; 5× SSC; 5×Denhardt's solution; 0.1% SDS; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured salmon sperm DNA) 을 각각 9 ml 첨가한 다음, 3 ml의 50% dextran sulfate를 첨가하여 42°C에서 3시간 동안 prehybridization을 실시하였다. [α - ^{32}P] 로 표지한 probe DNA를 첨가하여 42°C에서 18시간 동안 hybridization을 실시한 다음, membrane을 42°C에서 2× SSC-0.1% SDS 용액으로 20분 및 0.1×SSC-0.1% SDS 용액으로 1시간 세정하고, intensifying screen을 이용하여 -80°C에서 X-ray film에 노출시켰다.

10. Northern blot 분석

Northern blot 분석은 Thomas (1983)의 방법으로 실시하였으며, 모든 전기영동 장치는 하루 전에 2% Absolve NEF-971 solution (Daichi chem, Japan)으로 처리하여 RNase를 제거한 다음 멸균수로 헹구어 사용하였다. 15 μg 의 total RNA를 5 μl 의 멸균수에 완전히 녹인 다음, 15 μl 의 RNA sample buffer와 1 μl 의 Et-Br (1 mg/ml)를 첨가하였다. 65°C에서 15분간 변성시킨 다음, 1.2% formaldehyde agarose gel에서 40 V, 4시간 동안 전기영동을 실시하였다. Gel을 10×SSC로 20분간 세정한 다음 Funapad (Funakoshi, Japan)를 이용하여 capillary transfer 방법으로 gel 상의 RNA를 membrane으로 transfer하였다.

Membrane을 UV-crosslinker로 fixation하고 2×SSC로 5분간 세정한 다음, high stringency 조건으로 Southern blot 분석에서와 동일한 방법으로 hybridization하였다. Hybridization probe로는 각각의 유전자에 특이적인 probe를 PCR로 증폭하여 사용하였다.

11. PCR 증폭

PCR 반응은 *Taq* DNA polymerase reaction buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 1.5 mM MgCl₂; 0.01% gelatin; 0.1% Triton X-100)에 0.2 mM의 dNTP mix, 100 pmol의 sense 및 antisense primers, 100 ng의 template DNA 그리고 2 units의 *Taq* DNA polymerase (Takara, Japan)를 첨가하여 수행하였으며, 50 μ l의 mineral oil을 첨가하여 반응액의 증발을 방지하였다. 반응은 Personal Cyclor (Biometra, Germany)에서 30-35 cycle을 실시하였다. 1 cycle은 denaturation을 94°C에서 1분간, annealing을 50-63°C에서 1분간 그리고 extension을 72°C에서 1분간으로 하여 수행하였다. 본 연구에서 사용된 PCR primers는 표 2-1에 표시하였다.

12. DNA 염기서열 결정 및 분석

DNA의 염기서열은 dideoxy chain termination 방법 (Sanger 등, 1977)으로 실시하였다. DNA clone을 제한효소로 이중 절단한 다음, Exonuclease III와 Mung-bean nuclease를 처리하여 연속된 nested-deletion mutant를 제작하였다. 순차적으로 deletion된 clone으로부터 Wizard Miniprep kit (Promega, USA)를 사용하여 plasmid DNA를 분리하였으며, ALFexpress AutoRead Sequencing kit (Pharmacia, USA)와 ALFexpress DNA Sequencing System (Pharmacia, USA)을 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 결정된 DNA 염기서열은 GENETYX-MAC program (SDC software Development, Tokyo, Japan)과 DNASIS program (Hitachi Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 ORF와 hydrophathy를 분석하였으며, 상동성 검색을 위하여 Basic Local Alignment Search Tools 알고리즘 (BLAST, Altschul 등, 1990)을 이용하여 nucleotide 및 아미노산 서열의 상동성을 검색하였다.

Table 2-1. PCR primers used in this study

Primer	Sequence
pqr5N	5' - CTGGCACTTATCTTCGTCG - 3'
pqr3C	5' - TTAGCGGATCCCGCTCGTC - 3'
pqr-SalIIs	5' - GTCGACCGTTACGGACAAAG - 3'
pqr-SalIIas	5' - GTCGACCACCCAACCGGAAAC - 3'
pqrAs ₁	5' - GAAGCTTCGGCATAACCAAC - 3'
pqrAas ₁	5' - CTTACCCGCTCGTCCCTATCTA - 3'
pqrR1s	5' - GTTAAACATGCTGTTCCTCGAC - 3'
pqrR1as	5' - AGTAGCTAGATAGGGACGAG - 3'
pqrR2s	5' - CTTGCATACGGTCCGTATGT - 3'
pqrR2as2	5' - ATCCTGACAGGCGATACCTC - 3'
pqrA-XbaIIs	5' - CGGACCGTATGCAAGTCTAGAAAT - 3'
pqrA-SacIIas	5' - CTTACGAGCTCGTCCCTATCTAGCTA - 3'
NPTIIIs	5' - GAGGCTATTCGGCTATGACTG - 3'
NPTIIas	5' - ATCGGGAGCGGCGATACCGTA - 3'
35Ss1	5' - CCCACCCACGAGGAGCATC - 3'
pqrAas ₂	5' - GCGCCTGAAATATAGACCAGTTC - 3'
35S-XbaIIs	5' - GGCCATCGTTCTAGATGCCT - 3'
35S-SpeIIas	5' - GTCTTGCGAAGACTAGTGGG - 3'
pBEs	5' - CCATGATTACGCCAAGCTTGCA - 3'
pBEas	5' - GCTTGATATCGAATGCATGCAGC - 3'
35S-Es	5' - CGCAATTAACCCTCACTAAAGG - 3'
35S-Eas	5' - AGCTTGATATCGAATTCATGCAG - 3'

13. 항체의 제작

가. PqrA 단백질의 과발현

pqrA 유전자 산물의 과발현을 위하여 glutathione S-transferase (GST) gene fusion system (Pharmacia-LKB)의 pGEX-4T-1 DNA를 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단한 다음, *orf1* (1.2 kb)의 N-terminal의 0.6 kb를 제외한 0.6 kb 단편 (189 amino acids)을 PCR로 증폭하여 도입하였다. 재조합된 발현 vector, pGEX-pqr0.6을 *E. coli* JM109에 형질전환하였으며, reading frame이 맞는지의 여부는 pGEX sequencing primer (Pharmacia-LKB)를 사용하여 DNA sequencing으로 확인하였다.

단백질의 과발현을 위하여 *E. coli*의 성장이 log phase 초기 ($A_{660} = 0.4$)일 때 IPTG를 최종농도 0.5 mM의 농도가 되게 첨가하여, 30°C에서 6시간 더 배양하여 단백질의 발현을 유도하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 후, 1×PBS buffer (137 mM NaCl; 2.6 mM KCl; 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4; 4 mM Na_2HPO_4)에 현탁하였다. 초음파 파쇄기 (Ultrasonic homogenizer, Cole-Parmer)를 이용하여 얼음위에서 균체를 파쇄한 다음, 4°C, 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 soluble protein fraction과 insoluble protein fraction (inclusion body)으로 분리하였다. SDS-sample buffer를 첨가하여 Laemmli (1970)의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분석하였다. 발현된 단백질은 Glutathione Sepharose 4B column (Pharmacia, USA)을 이용하여 정제한 다음, preparative SDS-PAGE로 fractionation하여 fusion 단백질 band만을 잘라내어 주사기로 파쇄하여 TE buffer로 단백질을 회수하였다.

나. 항체유도 및 이중면역확산 분석

Polyclonal 항체를 유도하기 위하여 정제된 단백질 0.2 mg에 Complete Freund's adjuvant (sigma, USA)를 동량으로 첨가하여 잘 섞은 다음, 토끼의 피하에 주사하였

다. 주사 후, 2주 이후에는 매 2~3주 간격으로 Incomplete Freund's adjuvant (sigma, USA)를 사용하여 항체 생성이 확인 될 때까지 반복 주사하였다.

이중면역확산 분석은 Ouchterlony와 Nilson (1986)의 방법으로 실시하였다. 0.9% agarose gel을 0.5×TBE buffer에 녹이고 직경 90 mm petri-dish에 20 ml씩 붓고 gel을 응고시킨 후, 중앙의 well에 항체를 첨가하고 outer well 5개에 항원을 넣어 4°C에서 20시간 반응시킨 후 침강선을 확인하였다.

14. Immunoblot 분석

단백질은 Protein assay kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질 농도를 계산한 다음, lane 당 20 μ g의 단백질을 loading하여 SDS-polyacrylamide gel (12%) 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 TGM buffer에 5분간 세정한 다음 semi-dry blot 장치 (Atto, Japan)를 사용하여 10 V, 2시간 동안 nitrocellulose membrane (Protran, Schleicher & Schuell, Germany)에 transfer하였다. Transfer한 membrane은 blocking 용액에 담구어 상온에서 1시간 동안 shaking하고, 2,000배로 희석한 1차 항체와 1시간 동안 반응시켰다. TTBS buffer로 2회 세정한 membrane은 blocking 용액에서 다시 2,000배 희석한 2차 항체 (AP-conjugated Goat anti-Rabbit IgG, KPL)와 상온에서 1시간 반응시키고 NBT 용액과 BCIP 용액으로 발색시켰다.

15. 기타 분자생물학적인 기본적인 기법들은 standard 방법을 이용하였으며, 식물 조직배양 및 형질전환에 이용한 방법들은 결과에서 설명하였다.

제3절 Paraquat 내성유전자 발현조절기구의 해명

1. 토양으로부터 paraquat 내성균인 *Ochrobactrum anthropi* JW-2의 선발

Paraquat을 수년간 살포한 경상북도 군위군 일대의 과수원 토양 추출액으로부터 paraquat에 대하여 내성을 가지는 균을 선발하였다. *E. coli* JM105를 대조균으로하여 선발균을 paraquat 0.5~40 mM이 첨가된 LB 배지에서 10시간 배양한 후, 흡광도를 측정하여 성장정도를 확인한 결과, 선발균은 10 mM의 paraquat에서도 paraquat을 첨가하지 않은 배지에서와 동일하게 성장하였으나, 대조균인 *E. coli* JM105는 1 mM 이상에서는 자라지 못하였다 (그림 2-1). 선발균의 분류학적 위치를 확인하기 위하여 형태적 및 생리적 특성을 조사한 결과, 그람 음성 세균으로 catalase와 oxidase에 대해 양성 반응을 나타내었다 (표 2-2). 탄소원 이용능을 조사한 결과에서는 glucose, malate, arabinose 및 maltose 등을 이용하였으며 (표 2-3), 지방산 조성에서는 oleic acid (C18:1)가 세포 지방산 조성의 대부분으로 전체 지방산 함량의 80.6%를 차지하는 것으로 나타났다 (표 2-4). 이상의 결과로부터 선발 균주를 *Ochrobactrum anthropi*로 동정하였고, 최종적으로 *O. anthropi* JW-2로 명명하였다. *O. anthropi* JW-2의 배양 적정 온도는 30°C였으며, 적정 pH는 7.2~7.8을 나타내었다.

*E. coli*에서 paraquat (PQ^{2+})은 수용성 cytosolic NADPH-dependent diaphorase에 의해 $PQ^{\cdot+}$ (monocation radical)로 환원되어 세포 내로 들어가며, $PQ^{\cdot+}$ 는 O_2 와 반응하여 활성산소인 $O_2^{\cdot-}$ 를 생성하고 이를 제거하기 위해 항산화효소인 SOD의 합성이 유도된다 (Kao와 Hassan, 1985). 따라서, *O. anthropi* JW-2의 paraquat에 대한 내성이 SOD 활성의 증가에 의한 것인지를 확인하기 위하여 *O. anthropi* JW-2를 0.1 mM paraquat이 첨가된 배지에서 3시간 배양한 후 total protein을 추출하여 native polyacrylamide gel 전기영동을 실시하고 SOD 활성염색을 하였다. 대조구로 paraquat에 약한 내성을 나타내는 *E. coli* JM105와 *O. anthropi* JW-2를 paraquat으로 처리한

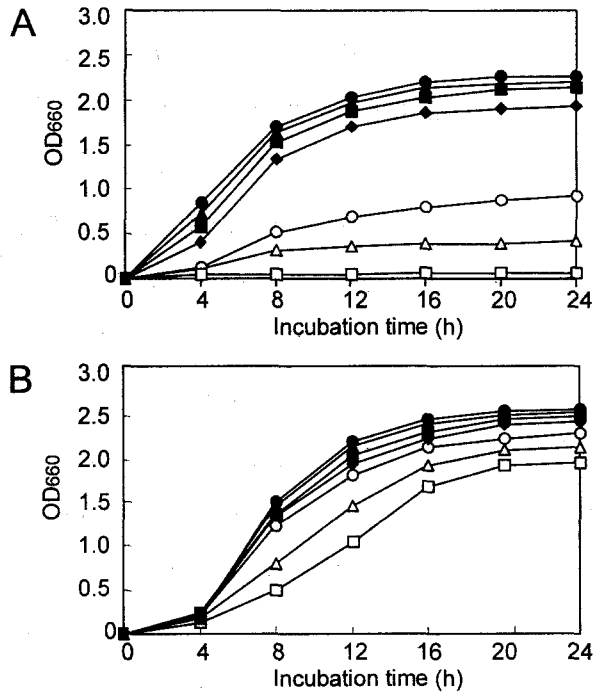


Fig. 2-1. Effect of paraquat concentration on the growth of *E. coli* JM105 (A) and *O. anthropi* JW-2 (B). (●, control; ▲, 10⁻⁶ M; ■, 10⁻⁵ M; ◆, 10⁻⁴ M; ○, 10⁻³ M; △, 10⁻² M; □, 10⁻¹ M paraquat)

Table 2-2. Morphological and physiological characteristics of isolated *O. anthropi* JW-2

Gram staining	-
Oxidase	+
Catalase	+
Fluorescence pigment	none
β - Galactosidase	-
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	-
H ₂ S production	-
Urease production	+
Tryptophane deaminase	-
Indole production	-
Voges-Proskauer reaction	-
Gelatinase production	-
Nitrate reduction	+
Denitrification	+
β - glucosidase production	-

+, Positive; -, Negative

Table 2-3. Assimilation of carbon sources by *O. anthropi* JW-2

Carbon compounds	Assimilation
Adipate	-
Arabinose	+
Caprate	+
Citrate	+
Gluconate	-
Glucose	+
Malate	+
Maltose	+
Mannitol	-
Mannose	+
N-Acetyl-glucosamine	+
Phenyl-acetate	-

+, Positive; -, Negative

Table 2-4. Cellular fatty acid composition of *O. anthropi* JW-2

Fatty acids	Contents (%)
Straight-chain acids	
C _{18:1}	80.6
C _{18:0}	8.1
C _{16:0}	4.0
C _{18:1} 2OH	1.2
Cyclopropane acid	
C _{19:0}	2.4
Unknown	3.7

후 SOD 활성 염색을 한 결과 (그림 2-2), *E. coli*의 경우는 paraquat 처리에 의해 새로운 SOD isoenzyme의 band가 관찰되었으나, *O. anthropi* JW-2의 경우는 paraquat 처리시 새로운 SOD isoenzyme의 band가 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 SOD의 활성의 변화도 없었다. 이러한 결과는 *O. anthropi* JW-2의 paraquat에 대한 내성이 세포 내 활성산소 생성으로 인한 항산화효소의 활성 증가에 의한 것이 아니라 다른 방어 기작으로 인한 것임을 의미하는 것이다.

2. *Ochrobactrum anthropi* JW-2로부터 paraquat 내성유전자의 분리

선발된 토양 미생물 *Ochrobactrum anthropi* JW-2로부터 genomic DNA를 분리하여 제한효소 *Sau3AI*으로 부분분해한 다음, 2~6 kb 크기의 DNA 단편을 회수하여 제한효소 *Bam*HI으로 절단한 pBluescriptII SK+에 도입하였다. 재조합된 plasmid DNA를 *E. coli* DH5 α 에 형질전환한 후, 0.1 mM의 paraquat이 첨가된 LB plate에 도말하여 살아남은 11개의 colony를 선발하였다. 선발된 colony를 다시 3 mM의 paraquat이 첨가된 LB 배지에 배양하여 성장속도가 가장 빠른 1개의 clone을 선발하였다. 선발된 colony를 LB 배지에서 배양한 다음, plasmid DNA를 분리하여 확인한 결과 2.5 kb의 insert DNA 단편을 포함하는 것으로 나타났다 (그림 2-3). 따라서, 이 insert DNA 단편이 포함된 plasmid가 *E. coli*에 paraquat 내성을 부여하였으므로 이를 pBpq2.5로 명명하였다.

선발된 pBpq2.5의 paraquat 내성을 확인하기 위하여 pBluescriptII SK+로 형질전환된 *E. coli* DH5 α 와 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli* DH5 α 를 각각 0~3 mM의 paraquat이 첨가된 LB 배지에 배양하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 성장정도를 비교하였다 (그림 2-4). 그 결과, 대조군인 pBluescriptII SK+로 형질전환된 *E. coli* DH5 α 는 0.1 mM 이상의 paraquat 농도에서 성장이 급격히 감소하기 시작하여 0.5 mM 이상의 농도에서는 거의 성장을 하지 못하였다. 그러나 pBpq2.5로 형질전환

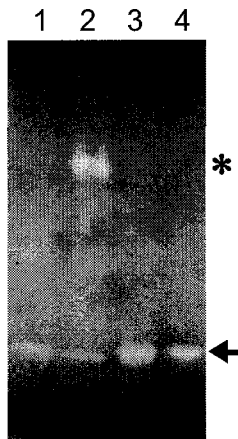


Fig. 2-2. SOD activity staining of polyacrylamide gel containing total proteins of *O. anthropi* JW-2 and *E. coli* JM105.

After native gel (7.5 %) electrophoresis, the gel was assayed for SOD activity. Each lane contains 200 μ g of protein. Lanes 1, *E. coli* JM105 unexposed to paraquat; 2, *E. coli* JM105 exposed to 0.1 mM paraquat; 3, *O. anthropi* JW-2 unexposed to paraquat; 4, *O. anthropi* JW-2 exposed to 0.1 mM paraquat. Arrow indicates constitutively expressed SOD protein and asterisk represents newly synthesized SOD protein by paraquat treatment.

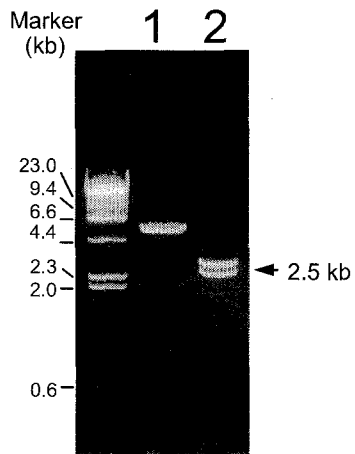


Fig. 2-3. Restriction enzyme analysis of plasmid pBpq2.5.

Plasmid DNA was digested with either *Xba*I (lane 1), or *Xba*I and *Kpn*I (lane 2), and separated on a 0.8% agarose gel. Arrow indicates 2.5 kb insert DNA.

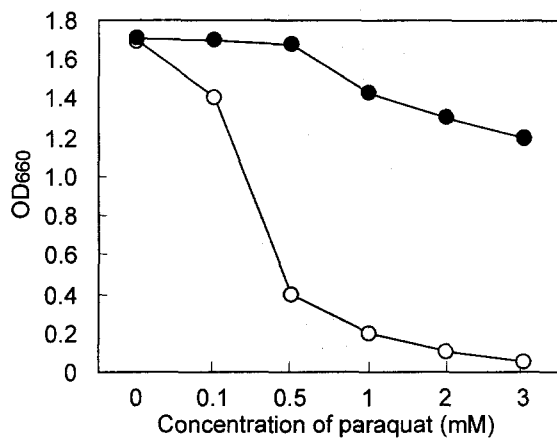


Fig. 2-4. Growth of *E. coli* cells transformed with either pBluescriptII SK+ (open circles) or pBpq2.5 (solid circles) in LB medium containing different concentrations of paraquat.

After grown at 37°C overnight, optical density of each culture was measured at 660 nm.

된 *E. coli* DH5 α 는 대조군에 비해 높은 성장을 보였는데, paraquat 무첨가구와 비교할 때 0.5 mM까지는 성장에 전혀 저해를 받지 않았으며 0.5 mM 이상에서는 다소 감소하기 시작하였으나, paraquat 농도 1 mM 일때의 성장치를 기준으로 비교할 때 대조군보다 6배 이상 높은 내성을 나타내었다. LB agar plate에 paraquat 1 mM을 첨가하여 배양하였을 때에도 액체 배지에서와 같은 결과를 나타내었는데, 대조군은 전혀 colony를 형성하지 못하였으나 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli* DH5 α 는 정상적으로 colony가 형성되었다 (그림 2-5).

또한, paraquat 처리에 의한 성장속도를 확인하기 위하여 paraquat 0.5 mM을 첨가한 LB 배지에서의 배양시간별 성장률을 흡광도로 조사하였다. 그 결과, 대조군은 전혀 성장하지 못하였으나 plasmid pBpq2.5를 가지고 있는 *E. coli* DH5 α 는 paraquat 무첨가구에 비해 초기성장이 8시간 정도 지연되기는 하였으나 배양 16시간 이후에는 paraquat 무첨가구와 비슷한 성장값을 나타내었다 (그림 2-6). 배양 초기에 보였던 8시간 정도의 log time은 내성균주 선발 때 사용했던 paraquat 농도 (0.1 mM) 보다 높은 농도인 0.5 mM paraquat 처리에 따른 *E. coli* 자체의 성장저해에 따른 것과 *E. coli* 내의 plasmid pBpq2.5의 세포당 copy number가 증가하기 위해 필요한 시간에 따른 결과일 것으로 판단된다. 이러한 결과들은 paraquat 내성균주인 *O. anthropi* JW-2로부터 분리한 2.5 kb의 DNA단편이 대장균에 paraquat 내성을 부여했음을 의미한다. 따라서, pBluescriptII SK+에 삽입된 2.5 kb크기의 insert DNA를 paraquat 내성 (paraquat resistant) 유전자 즉, *pqr*로 명명하였다.

3. paraquat 내성유전자, pBpq2.5의 DNA 염기서열 결정 및 분석

가. 제한효소 지도의 작성

Paraquat 내성유전자 (*pqr*)를 가지고 있는 pBpq2.5를 여러가지 제한효소로 절단한

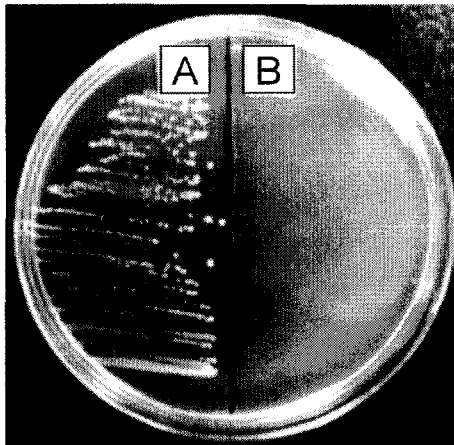


Fig. 2-5. *E. coli* cells containing plasmid pBpq2.5 show an increased resistance to paraquat.

E. coli (DH5a) cells were transformed with either plasmid pBpq2.5 (A) or pBluescriptII SK+ (B). Transformants were streaked on LB medium containing 1 mM paraquat.

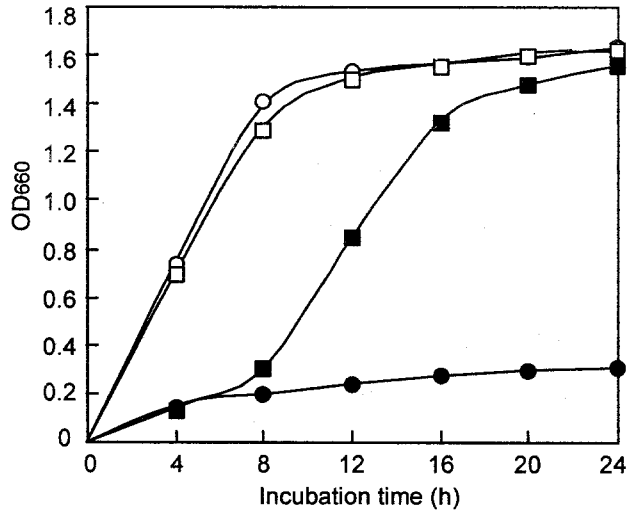


Fig. 2-6. Growth of *E. coli* cells transformed with either plasmid pBpq2.5 (squares) or pBluescriptII SK+ (circles).

Transformants were grown in either liquid LB medium (open symbols) or LB medium containing 0.5 mM paraquat (solid symbols).

다음, 전기영동하여 절단된 insert DNA의 수 및 이동거리를 조사함으로써 제한효소 지도를 작성하였다 (그림 2-7A). 삽입된 2.5 kb의 insert DNA 내에 *Pst*I은 3개의 제한효소 절단부위가 존재하였으며, *Sal*I은 2개 그리고 *Apa*I, *Eco*RI 및 *Hind*III의 제한효소 절단부위는 각각 1개가 존재하였다.

나. Deletion clone의 제작

pBpq2.5 DNA를 제한효소 *Eco*RI과 *Kpn*I으로 절단한 다음, exonucleaseIII와 Mung-bean nuclease로 처리하여 연속된 nested-deletion mutants를 제작하였다. Antisense deletion을 위하여는 pBpq2.5를 제한효소 *Hind*III로 절단한 다음 2.1 kb 단편을 pUC119에 ligation하여 제한효소 *Kpn*I과 *Xho*I으로 절단한 다음 deletion mutants를 제작하였다. 양방향으로 각각 200-250 bp 씩 크기가 순차적으로 deletion된 15개의 mutants를 선발하여 DNA 염기서열을 결정하였다 (그림 2-7B).

다. DNA 염기서열 결정

pBpq2.5에 삽입된 2.5 kb insert DNA의 전체 염기서열을 ALFexpress AutoRead Sequencing kit (Pharmacia, USA)와 ALFexpress DNA Sequencing System (Pharmacia, USA)을 이용하여 결정하였다.

O. anthropi JW-2의 genomic DNA로부터 분리된 유전자의 총길이는 2,520 bp였으며 전체 염기서열로부터 추정되는 모든 open reading frame (ORF)을 조사해본 결과, 개시 codon과 종결 codon을 가지는 1개의 완전한 ORF와 개시 codon 또는 종결 codon만을 가지는 두개의 불완전한 ORF가 발견되었다. 그 중 *orf1* (nucleotide position 643-1875)은 1,230 bp의 nucleotide와 410개의 아미노산으로 구성되어 있었고, 추정되는 단백질의 분자량은 42,847 Da이었다. 또한 대부분의 원핵생물에서 공통적으

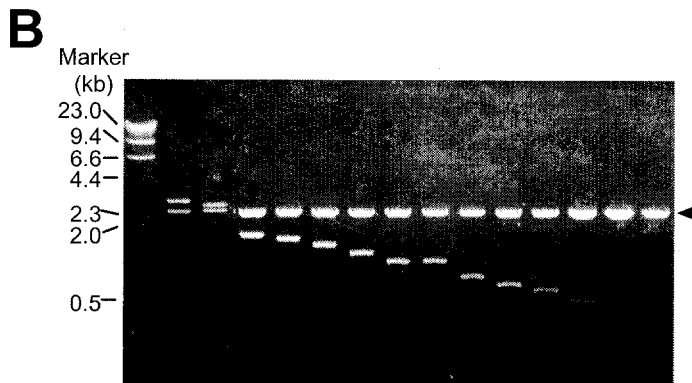
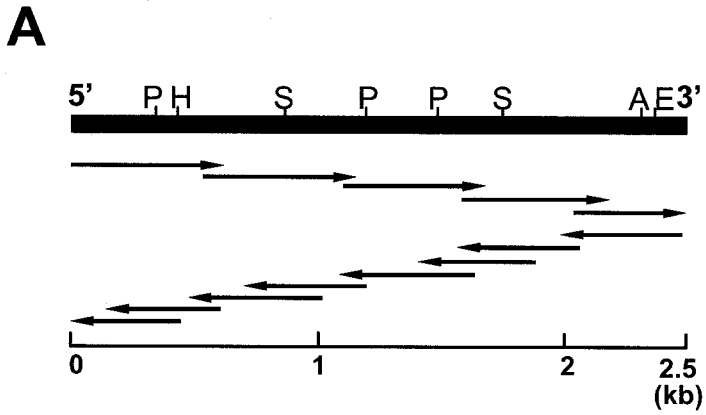


Fig. 2-7. Construction of nested deletion clones containing different sizes of insert DNA.

A, Deletion clones. Arrows indicate orientations and positions of nested deletion clones. B, Agarose gel electrophoresis of deletion clones. Arrowhead indicates vector DNA of pBluescriptII SK+.

로 발견되는 promoter 염기서열인 -35 영역 (TTGACA)과 -10영역 (TTTAAT)이 개시 codon ATG로부터 80 및 56 bp 상류에 각각 존재하였으며, ribosome binding site (Shine-Dalgarno 배열)인 AAGGA도 개시 codon의 10 bp 상류영역에 존재하였다 (그림 2-8). 따라서, 완전한 promoter 영역과 ORF를 포함하고 있는 *orf1*을 *pqrA* 유전자로 명명하였고, 그 유전자 산물을 PqrA로 명명하였다 (그림 2-9). 그 외에 2개의 ORF가 더 존재하였는데 *pqr* 유전자의 3' 쪽의 개시 codon이 없고 종결 codon 만을 가지고 있는 ORF를 *orf2*, 5' 쪽의 종결 codon이 없고 개시 codon 만을 가지고 있는 ORF를 *orf3*로 각각 명명하였다. *orf2*와 *orf3*는 *pqrA* 유전자의 방향에 대해 반대 방향으로 coding되어 있었다 (그림 2-9).

추정되는 *pqrA*의 개시 codon (643번째 염기)이 보다 상류나 하류 영역에 있을 가능성이 있기는 하나, *pqrA*의 상류에서는 원핵생물 및 진핵생물에서 발견되는 가장 일반적인 개시 codon인 ATG가 존재하지 않는다는 점과, 일부 원핵생물 유전자의 개시 codon으로 이용되는 GTG가 nucleotide position 25와 389에서 각각 발견되었으나 바로 뒤에 종결 codon이 발견된다는 점, *pqrA* 유전자의 5' 상류와 3' 하류에 원핵생물 유전자의 전사를 종결시키는 구조로 알려진 stem-loop서열이 존재한다는 점, 그리고 ribosome binding site가 대부분 원핵생물 유전자에서 공통적으로 발견되는 위치인 개시 codon으로부터 5-13 bp 상류에 존재하고 -35 영역과 -10 영역 또한 존재하는 등의 결과로 미루어 보았을 때 추정된 개시 codon으로부터 종결 codon까지 410개의 아미노산으로 구성된 *pqrA*가 paraquat에 내성을 부여하는 완전한 ORF 중 하나일 것으로 추정되었다.

라. 염기서열의 분석

결정된 *pqr*의 염기서열 분석은 DNASIS (Hitachi Co., Tokyo, Japan)와 Genetyx software (SDC Software Development, Tokyo)를 이용하였다.

pqr5N →

1261 CGTTCCGCTATCTGGTCGCGTCCCGTTCAGATCATCACGCTGGCACTTATCTTCGTCGGC 1320
R S A I W S R P V Q I I T L A L I F V G 226

1321 TCGACCTTTGCGACAGCCGAAGTCAGTGCCTGTAGCGATCACAAGCGAGCTTGGTCAGCCC 1380
S T F A T A E V S A V A I T S E L G Q P 246

1381 GGTGCGCCAGCCTTGTGATCGGTGTCTATGCCATCGGTCGTTTCTTGTGGGATAACG 1440
G A A S L V I G V Y A I G S F L V G I T 266

1441 CTCGGTGCATTGTTCGCTTCGATGCCCTGCAGCGCCAGTTGATGATTGCCCGTCAGCGTG 1500
L G A L S L R M P L Q R Q L M I A V S V 286

1501 CTGGCACTGACTGCCTTGCCATTACCCTTCGCGGGCACATCGACCACGCTTCTTGCCGTG 1560
L A L T A L P L P F A G T S T T L L A V 306

1561 GCGGTGTTTCGTCAGCGCGTTGCGATTCTCCGACATTCATCACGGCCTTCGGCCTTATC 1620
A V F V S G V A I S P T F I T A F G L I 326

1621 GAACCGCGCTGCCTGAGACGATGCTGACGGAAGGCATTACCTGGGTTCATGCCGGCATC 1680
E R R V P E T M L T E G I T W V M T G I 346

SalI

1681 GGCATCGGAATGGCGTTTGGTTCGTTTCCGGTTGGGTGGTTCGACAATTTCGGTGCA 1740
G I G M A F G A F V S G W V V D N F G A 366

1741 GCAAACGGCTTCTGGGTTTCTGTGTGTCGCCAGCCTGAGCGCGGTTGCAACCGTCGCGCTT 1800
A N G F W V S V V A S L S A V A T V A L 386

1801 GGTCAAGTCAGCCTGTCCGGCACGCGGAAGCAGCCGAATGCGACGCGCTGTGCGCAGCA 1860
G Q V S L S G T R E A A E C D A L C A A 406

1861 GAAGCGCAGAGTAGCTAGATAGGACGAGCGGGTAAGGCCGCTCGTCAATCTCCGTAA 1920
E A A E *** ← **pqr3C** 410

1921 ATACGGTTTTCCAGCGGTGTGGAAGCGATCAATCCCTTCAATCCGGCCAGCATGGCTTTC 1980

1981 TCGGCCTTGTGTGAGATTGGTTTCCGGATTGTGGATCAGGAAAACATCGATGGCGGGCGGG 2040
>> >>>> <<<<<< <<

2041 TTGTCGTAAGGCGGCAACGCCAGAGAAGGCCGTATCAATCTCGCGTCGCGCCACGTGC 2100

2101 AGCGGAAGCGGACCGATGCCAAGGCCGTAATGATCATCCGGCGCACTTCTTCAAGGCTC 2160

2161 GACGAGGTGCCGACGACATCCGGTGAAGCCGCGCTCACTGCGCAGCAGCTACCGGG 2220

2221 CGCAGCGGTGAGCAATGTGGTCGGTCTGGAATGAAACCGACGTTCTCCCTTCAGATCG 2280

2281 GCAAGCGTCAGTCCGACTGGCCGAACATCCGGTCCGGGGCCCGAGAAAAAGCCGAAG 2340

2341 AATTACGATAGACCATGGTGTAGTCGAGCGCCGATCAGATTGCTCACCAGCCCAAGA 2400

2401 CCGAAAAGAAGCGCCTTCTCTCGAACCAGTCGAGCAACTTCGGTGTGCGGAAACATTG 2460

2461 ATTGTCAGCGTCGCTCGCGGATGCTGTTCATGAAAAGCTCAAGTGCCCGGTCGAAGATC 2520

Fig. 2-8. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *pqrA* gene in *O. anthropi*.

Nucleotides and amino acid residues are numbered from 5' -end and N-terminus, respectively. Deduced amino acid sequences for *pqrA* are shown below the DNA sequence. The putative promoter elements (-35 and -10 regions) are boxed, and possible ribosome binding site (Shine-Dalgarno, SD) is underlined. Potential transcription terminator sequences of stem-loop structures (> <) are indicated. Hybridization probe DNA fragment of 0.9 kb used in Southern and northern blot analyses is underlined. Arrows indicate positions and orientations of primers, *pqr5N* and *pqr3C*, used in PCR to produce GST-PqrA fusion protein in *E. coli*.

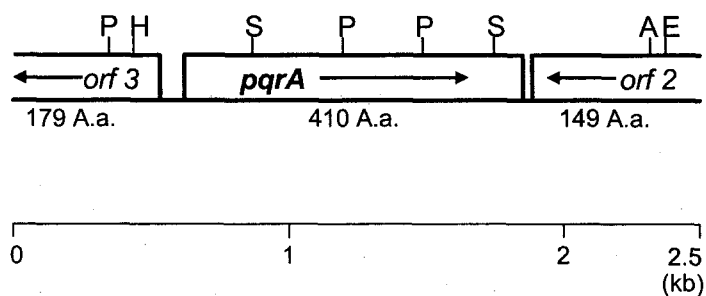


Fig. 2-9. Structure of 2.5 kb-genomic DNA fragment containing *pqr* gene in *O. anthropi*.

Open reading frames (ORF) are shown by boxes. Arrows indicate orientations of ORFs. Restriction sites of *Pst*I (P), *Hind*III (H), *Sal*I (S), *Eco*RI (E), and *Apa*I (A) are shown. Numerals indicate number of amino acid residues of each ORF.

분석 결과, PqrA 단백질의 아미노산은 hydrophobic 잔기 (Val, Leu, Ile, Phe, Met 및 Ala)가 전체 잔기의 53%로 매우 높은 비율로 구성되어 있었으며 (그림 2-10A), PqrA의 isoelectric point (pI)는 4.89이었다 (그림 2-10B). Kyte와 Doolittle (1982)의 방법에 따라 이차 구조의 hydropathy profile 분석을 한 결과, 11개의 transmembrane helices 구조로 되어 있었고 helix 5와 6 사이에는 membrane의 cytoplasmic side로 추정되는 큰 hydrophilic loop가 있었다 (그림 2-11A). 또한 TMpred system (Hofmann와 Stoffel, 1993)을 이용하여 아미노산들의 특성을 분석한 결과, 11개의 hydrophobic region을 가지고 있는 integral membrane protein의 특성을 나타내었다 (그림 2-11B). 이와 유사한 구조를 가진 몇몇 유전자들이 분리되었는데 *Lactococcus lactis*로부터 분리된 multidrug transporter 유전자인 *lmrP*도 아미노산의 구성이 PqrA와 유사하게 나타났다 (Bolhuis 등, 1995). LmrP는 hydropathy 분석에서 12개의 membrane spanning segments로 구성되어 있으며, 중앙에 plasma membrane을 spanning하는 큰 hydrophilic loop영역이 하나 존재한다고 보고하였다. 또한 tetracycline 내성유전자인 *norA* (Yoshida 등, 1990)와 *Bacillus subtilis*의 multidrug 내성유전자인 *bmr*도 PqrA의 경우처럼 11 내지 12개의 membrane spanning segments로 구성되어 있다고 보고하였는데 (Neyfakh 등, 1991), 이러한 아미노산의 특성을 비교해 봤을 때 PqrA도 이들 유전자들과 유사한 기능을 할 것으로 추정되었다.

BLAST system을 이용하여 PqrA의 아미노산 서열의 상동성을 검색해 본 결과, 주로 약제 내성 관련 유전자 및 transporter 단백질들과 비교적 높은 상동성을 나타내었는데, *Streptomyces coelicolor*로부터 분리한 아직 그 기능이 밝혀지지 않았으나 아미노산 구성상 membrane protein으로 추정되는 SC9B10.25c (Redenbach 등, 1996)와 62%로 가장 높은 상동성을 나타내었으며 (identity 41%), *E. coli* tetracycline transporter 단백질인 TetA (31% identity, Allard and Bertrand, 1993)와 54%, *Salmonella typhimurim*으로부터 분리한 methyl viologen resistance 유전자 산물인 SMVA (30% identity, Hongo 등, 1994)와 52%, *E. coli* multidrug resistance 유전자

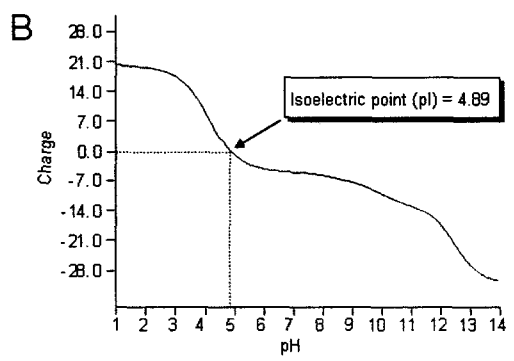
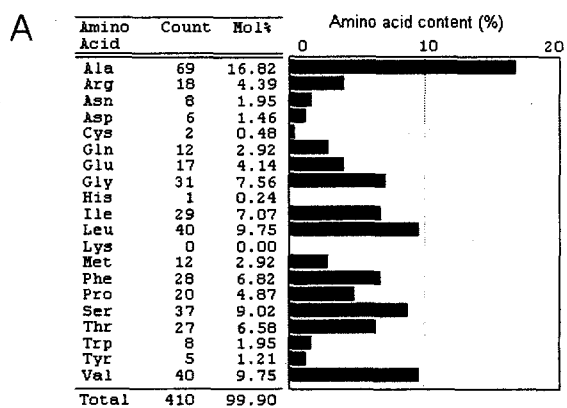


Fig. 2-10. Amino acid composition and isoelectric point of PqrA protein.

A, Molar percent of each amino acid residue in PqrA protein was represented as solid bars. B, Isoelectric point was calculated from deduced amino acid sequence of PqrA protein by DNASIS software.

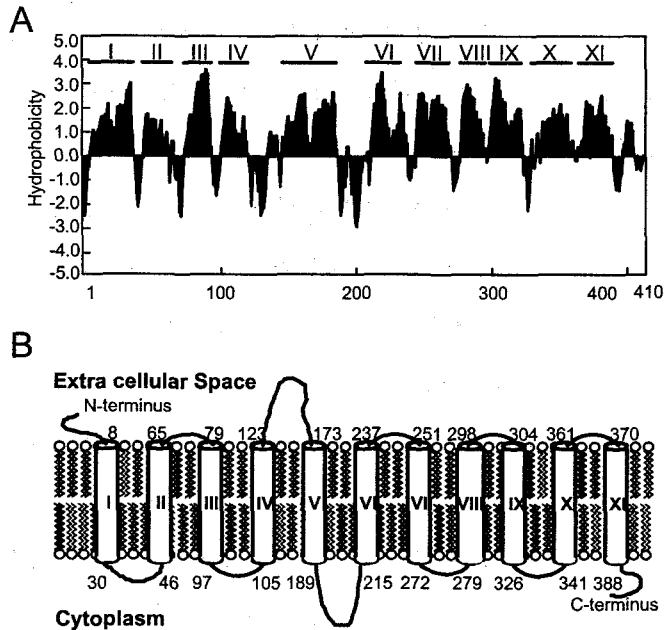


Fig. 2-11. Hydrophobicity plot and the proposed model of PqrA protein.

A, Hydrophobicity plot.

B, Model of PqrA protein. A computer-assisted hydropathy plot of PqrA was generated as previously described (Kyte and Doolittle, 1982) over running window of 11 amino acids. The *x* axis indicates the amino acid position and *y* axis indicates hydrophobicity values. Roman numerals denote transmembrane spans. The positions of amino acids at the membrane interface are indicated by Arabic numerals.

산물인 EmrB (29% identity, Fleischmann 등, 1995)와 52%의 상동성을 나타내었고, *Lactococcal lactis*로부터 분리한 multidrug transporter 단백질인 LmrP (29% identity, Bolhuis 등, 1995)와 50%의 상동성을 각각 나타내었다 (표 2-5). PqrA와 가장 높은 상동성을 보였던 SC9B10.25c와의 아미노산 배열을 비교해 본 결과, 각각의 단백질을 구성하는 아미노산 수가 비슷했을 뿐만 아니라 N-terminal에서 C-terminal까지 동일한 아미노산이 고르게 분포되어 있었다 (그림 2-12). 이러한 특징은 다른 약제 내성유전자들과의 아미노산 배열 비교에서도 동일하게 나타났다. 따라서, 본 연구에서 분리한 PqrA 단백질은 이들 약제 내성유전자들과의 높은 상동성과 단백질의 2차 구조상의 특성으로부터 추정해 보았을 때 약제 내성유전자들과 유사한 기능으로 내성을 부여하는 paraquat 내성 관련 유전자임을 추측 할 수 있었다.

Bolhuis (1995) 등은 *Lactococcus lactis*로부터 분리한 LmrP와 Bmr (Neyfakh 등, 1991), NorA (tetracycline resistance gene, Yoshida 등, 1990)의 아미노산 서열을 비교한 결과, 2개의 공통 아미노산 서열을 가지고 있었는데 공통 아미노산 서열 내에 있는 2번과 3번 transmembrane 단편이 cytoplasm에 속하는 큰 loop를 형성하며 이들 loop가 구조적으로 중요한 역할을 하는데 transporter에서 channel 개폐를 하는 역할을 한다고 추정하였다 (Pausen과 Skurry, 1993). 분리된 PqrA를 이들 유전자들의 아미노산과 비교해 본 결과 공통서열은 발견되지 않았으나 구조적으로는 5번과 6번 membrane spanning region 사이에 cytoplasm에 내재하는 큰 loop 구조가 발견되었는데 이 loop 구조가 Bohuis (1995)가 추정한 기능과 일치할 가능성을 보여 주었다 (그림 2-11B).

PqrA의 특성을 알아보기 위하여 앞서 검색한 유전자 중 그 기능이 밝혀지고 상동성이 높은 내성 관련 유전자들의 아미노산 배열에 대한 hydropathy profile을 비교해 본 결과 (그림 2-13), TetA, SMVA, 그리고 EmrB 모두 구조적으로 매우 비슷한 hydropathy profile을 나타내었는데, PqrA처럼 hydrophobic 아미노산들이 대부분으로 전체 아미노산의 50% 이상을 차지하고 있으며, transmembrane helix의 구조도 매우

Table 2-5. Percent identity (similarity) of PqrA protein with other related gene products

	SC9B	TetA	SMVA	EmrB	LmrP
PqrA	41 (62)	31 (54)	30 (52)	29 (52)	29 (50)
SC9B	—	29 (50)	28 (49)	28 (48)	28 (47)
TetA	—	—	31 (51)	28 (49)	28 (50)
SMVA	—	—	—	39 (52)	29 (50)
EmrB	—	—	—	—	29 (50)

Amino acid sequence of SC9B10.25c is taken from Redenbach *et al.* (1996), TetA from Allard and Bertrand (1993), SMVA from Hongo *et al.* (1994), and LmrP from Bolhuis *et al.* (1995).

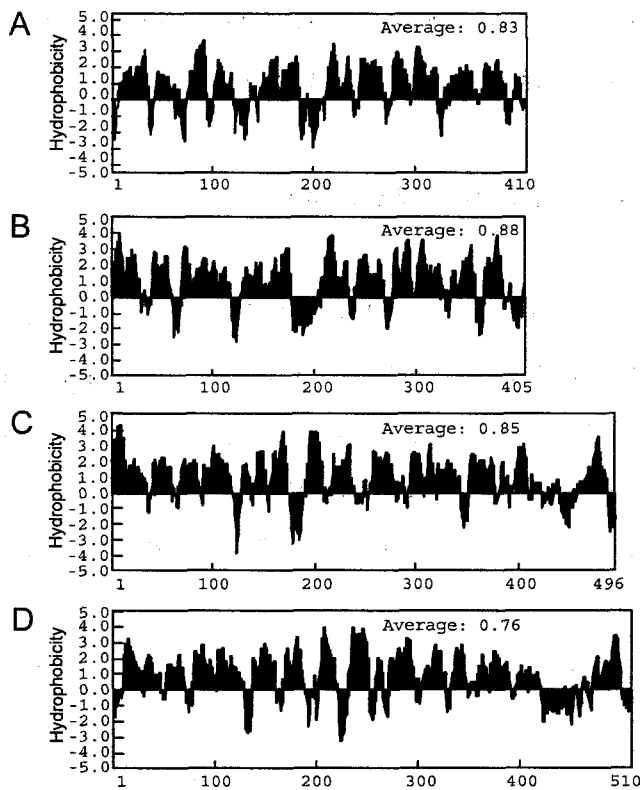


Fig. 2-13. Comparison of hydrophobicity plots of PqrA protein with other proteins of drug resistant genes.

The plots were generated as previously described (Kite and Doolittle, 1982). A, PqrA; B, TetA; C, SMVA; D, EmrB.

비슷하게 나타났다. 이처럼 소수성 아미노산이 많은 것은 막단백질의 특성 중 하나인데, 많은 소수성 아미노산들은 막 내부에 위치하는 내재성 (integral) 아미노산들로서 막 내부에서 helix 구조로 되어있어 여러 개의 membrane spanning region을 형성하게 된다. 막단백질의 기능도 능동수송, ion pump, ion channel 등 아주 다양한데 이들 약제 내성유전자들이 어떠한 기능에 의하여 약제 및 항생제에 대한 내성을 가지게 되는지 생화학적으로 분명하게 밝혀진 보고는 많지 않다.

4. Paraquat 및 다른 약제에 대한 내성의 확인

Paraquat은 세포 내에서 O_2 와 결합하여 활성산소인 O_2^- 를 과량으로 생산함으로써 미생물에 해를 주게 되는데 paraquat 뿐만 아니라 menadione과 plumbagin도 같은 기능을 하는 과산화 화합물의 일종이다 (Morimyo 등, 1992). 따라서, pBpq2.5를 가지고 있는 *E. coli* DH5 α 와 대조구로 pBluescriptII SK+를 가지고 있는 *E. coli* DH5 α 를 0~1 mM의 paraquat, menadione 및 plumbagin을 각각 처리하여 37°C에서 18시간 배양하여 그 성장정도를 A_{660} 에서 흡광도로 측정하였다. 그 결과, paraquat에 대해서는 pBpq2.5를 가지는 *E. coli* DH5 α 가 pBluescriptII SK+를 가지는 *E. coli* DH5 α 보다 더 높은 성장치를 나타내 내성을 보였으나, menadione과 plumbagin에 대해서는 전혀 내성을 보이지 않았다 (그림 2-14). 이러한 결과는 menadione과 plumbagin에 의해서는 세포 내 활성산소가 과량으로 생산되어 미생물 성장에 저해를 주게 되나 paraquat에 의해서는 세포 내 활성산소에 의한 저해작용이 억제되는 것으로 생각된다. 세포 내 활성산소가 억제되는 기작은 첫째, 세포 내로 유입된 paraquat이 도입된 유전자의 기능에 의해 활성을 가질 수 없는 화학적인 형태로 변형되거나 둘째, 생성된 활성산소를 빠른 속도로 무독화 시키는 경우, 그리고 셋째로 paraquat이 세포 내로 유입되지 않도록 하거나 유입되었다 하더라도 세포 외로 배출할 수 있는 membrane 단백질의 기능에 의한 것으로 추정된다. 이와 유사한 결과가 Morimyo 등(1992)에 의해 보

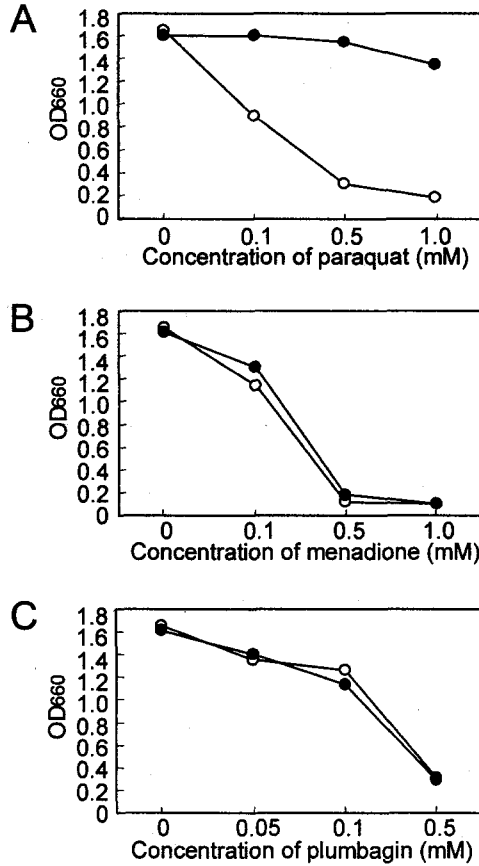


Fig. 2-14. Effect of superoxide generators on the growth of *E. coli* DH5 α with (solid circles) or without pBpq2.5 (open circles).

Cells were cultured in the various concentrations of paraquat (A), menadione (B) and plumbagin (C). Optical density of each culture was measured at 660 nm.

고되었는데 *E. coli* K-12로부터 분리한 paraquat 내성 유전자 *mvrC*의 paraquat 및 plumbagin에 대한 내성을 비교한 결과, paraquat에 대해서는 내성을 가졌으나 plumbagin에 대해서는 내성을 가지지 못하였다고 하였다.

Paraquat은 양이온 화합물이다. 따라서, 분리된 *pqrA*가 다른 양이온 화합물에 대해서도 내성을 가지는지를 확인하기 위하여 ethidium bromide (EtBr)을 처리하였다. pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli* DH5 *α*와 pBluescriptII SK+로 형질전환된 *E. coli* DH5 *α*를 EtBr 0~200 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가한 LB 배지에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, pBluescriptII SK+로 형질전환된 *E. coli* DH5 *α*는 EtBr 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 성장이 저해되었으나 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli* DH5 *α*는 내성을 나타내었다 (그림 2-15). Bolhuis (1995)는 *lmrP* 유전자의 transport 특성을 알아보기 위하여 세포에 hydrophobic cation 화합물인 EtBr를 처리하여 세포 내에 축적된 EtBr의 양을 측정하였는데 그 결과, *lmrP*가 도입된 세포는 EtBr에 대한 내성이 증가하였으며 세포 내 EtBr의 축적량도 감소하였다. 뿐만 아니라 다른 양이온 화합물인 daunomycin 및 tetraphenylphosponium (TTP^+)에 대해서도 내성을 가졌다고 하였다. *lmrP*는 그람 음성균으로부터 분리한 약제 내성유전자 *TetA*와 그람 양성균으로부터 분리한 약제 내성유전자 *Bmr* 등과 높은 상동성을 나타내었는데, 이들 유전자들은 세포막에서 energy 의존적인 배출 (energy-dependent efflux)을 촉매함으로서 내성을 가진다고 추정하였다. 또한, Lomovskaya와 Lewis (1992)은 *E. coli*의 multidrug resistance 유전자인 *emrB*에 대한 연구에서 *emrB*가 EtBr와 같은 양이온 화합물들에 대해서 내성을 나타내었으며, 상동성 검색 결과 *Staphylococcus aureus*의 multidrug resistance pump인 QacA, tetracycline resistance pump등과 높은 상동성을 나타냄에 따라 EmrB 단백질도 이들과 유사한 기능으로 양이온 화합물에 대해서 내성을 가진다고 하였다. 본 연구에서는 EtBr의 세포내 축적량을 직접적으로 증명하지는 않았지만 PqrA와 상동성이 높게 나타났던 LmrP와 EmrB의 아미노산의 membrane spanning 구조의 유사성과 EtBr에 대한 내성의 획득에 대한 특성을 비교

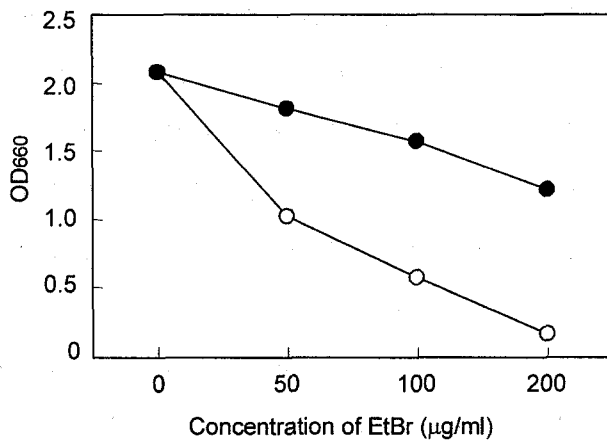


Fig. 2-15. Effect of ethidium bromide on the growth of *E. coli* DH5 α cells with (solid circles) or without pBpq2.5 (open circles).

해 보았을 때 PqrA도 paraquat 또는 다른 양이온 화합물에 대해서 energy-dependent efflux 작용에 의해 *E. coli*에 내성을 부여하는 것으로 추정되었다.

Yerusalumi 등 (1995)은 multidrug transporter의 유전자를 ABC type, TEXAN type 및 mini-TEXAN type으로 구분하였다 (Yerusalumi 등, 1995). ABC type의 대표적인 것으로 동물세포막에 존재하는 p-glycoprotein이 있는데, 이 transporter는 ATP 의존형으로서 아미노산 서열 내에 2개의 conserved sequence motif가 존재한다 (Schmees와 Schneider, 1998). 그러나 PqrA의 아미노산 서열 내에서는 이러한 conserved sequence가 존재하지 않았으며 따라서 PqrA는 ATP 의존형 transporter가 아님을 알 수 있었다. 또한 miniTEXAN type으로 대표적인 것이 *E. coli*의 multidrug transporter 유전자인 *emrE*가 있다. *emrE* 유전자는 110개의 아미노산으로 구성되어 있으며 paraquat 및 EtBr에 대해서 동시에 내성을 가졌는데, 이 유전자는 ATP에 의한 에너지 의존성이 아니라 proton의 전자화학적 밀도 구배에 의해서 EtBr을 efflux 한다고 보고하였다. PqrA는 410개의 아미노산으로 구성되어 있으며 아미노산의 크기 및 특성을 비교했을 때 TEXAN type으로 분류되었다.

Paraquat은 2분자의 pyridine으로부터 4,4'-bipyridyl을 형성시켜 이를 methyl chloride와 반응시켜 합성한 bipyridylium계의 제초제이다. 또 다른 bipyridylium계 제초제로서 diquat은 구조적으로 비슷하나 methyl chloride 대신에 ethylene dibromide와 합성하였는데 식물에서의 살초 작용은 paraquat과 유사하다. 따라서, 분리된 *pqrA* 유전자가 paraquat 이외의 bipyridylium계 제초제 중의 하나인 diquat에 대해서도 내성을 가지는지 확인하기 위하여 diquat을 0~2 mM로 처리한 후 18시간 배양하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, paraquat 뿐만 아니라 diquat에 대해서도 내성을 나타내었는데 그 성장 값도 paraquat을 처리했을 때와 유의적인 차이가 없이 동일하였다 (그림 2-16). 이러한 결과는 *pqrA* 유전자는 diquat에 대해서 paraquat의 경우와 같은 기능으로 내성을 부여함을 알 수 있었다. 이와 같은 연구가 Pohlenz 등 (1992)에 의해서 보고되었는데 *pcd* (phenylcarbamate degradation) 유전자는

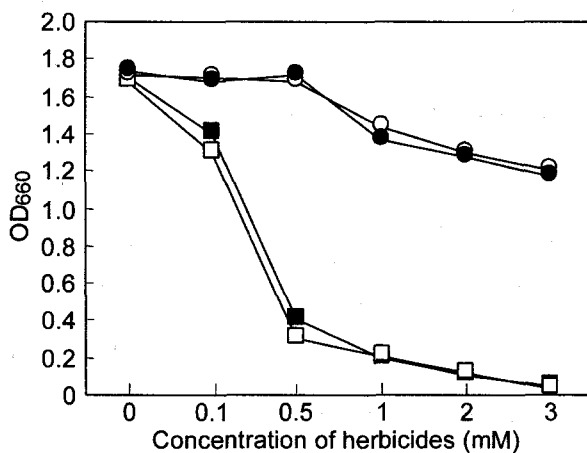


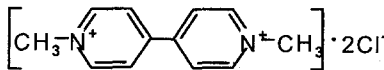
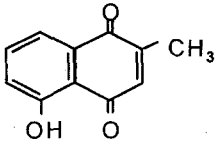
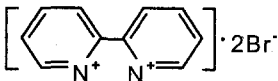
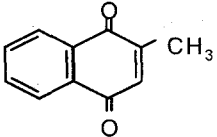
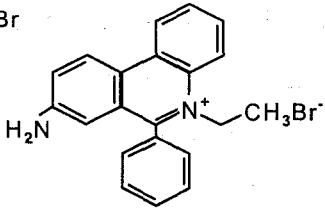
Fig. 2-16. Effect of bipyrindylum herbicides on the growth of *E. coli* DH5a cells transformed with either pBluescriptII SK+ (squares) or pBpq2.5 (circles).

Transformed *E. coli* cells were incubated in LB medium containing various concentrations of diquat (solid symbols) or paraquat (open symbols).

phenmedipham 뿐만 아니라 구조적으로 유사한 demedipham에 의해서도 내성을 가졌다. 또한, 제초제 atrazine을 분해하는 유전자인 *eptA*는 atrazine 뿐만 아니라 simazine, propazine에 대해서도 내성을 가졌다고 보고하였다 (Shao와 Behki, 1995).

이상의 PqrA의 내성 부여 기능을 확인하기 위하여 처리한 여러 가지 약제들 (menadione, plumbagin, EtBr, diquat)에 대한 실험 결과로부터 PqrA의 내성기구는 처리된 약제의 분자 구조와 관련이 있는 것이 아니라 기질의 화학적 상태와 관련이 있음을 알 수 있었다 (표 2-6). 즉, paraquat과 구조적으로 유사한 2개의 pyridine 분자구조를 하고 있고 세포 내에서의 기능도 paraquat과 유사한 menadione이나 plumbagin에 대해서는 내성을 가지지 못하였으나, paraquat과 화학적 상태가 비슷한 diquat과 EtBr에 대해서는 내성을 가졌다. 이것은 diquat과 EtBr은 분자구조 내에 paraquat과 같이 1가 혹은 2가의 양이온을 가지고 있고 PqrA는 이들 양이온을 인식함으로써 세포 내로의 유입을 억제하거나 유입된 물질을 세포 밖으로 능동적으로 수송할 것으로 추정된다. Yamaguchi 등 (1993)은 미생물의 MDR transporter protein에 대한 특성에 관한 연구에서 MDR transporter protein이 인식하는 기질은 양이온 화합물이 많으며 분자 구조상의 공통성은 없다고 하였다. 즉, 기질의 분자구조 자체를 인식하는 것이 아니라 화학적인 상태를 인식함으로써 배출을 하는데, 대부분의 약제는 확산에 의해 세포질막의 지질 이중층 내부로 침입하게 되고 MDR transporter protein은 지질 이중층에 원래 있는 성분이 아닌 비특이적인 물질을 인식하여 배출하는 특성이 있다고 하였다. 이러한 추정에 대해서 실험적인 증거를 보인 것이 Bolhuis 등 (1995)에 의해 보고된 antiporter형 MDR transport protein인 LmrP이다. LmrP는 세포막의 지질 이중층 내부에 있는 기질만을 배출하는데 양이온 화합물인 EtBr을 처리했을 때 세포막의 지질 이중층으로 유입된 EtBr을 drug-proton antiporter에 의해 세포 밖으로 유출시킨다고 보고하였다. 이러한 추정 및 실험 결과들로부터 미루어 보았을 때 PqrA 단백질은 paraquat 처리시 세포 내로 확산에 의해 유입된 paraquat을 분해하거나 불활성화 시키는 기작에 의한 것이 아니라, paraquat의 화학적 상태를 인식하여 세

Table 2-6. Structure of chemicals used in the resistance test in microorganisms.

Resistant chemicals	Sensitive chemicals
<p>Paraquat</p> 	<p>Plumbagin</p> 
<p>Diquat</p> 	<p>Menadione</p> 
<p>EtBr</p> 	

포 외로 배출시킴으로서 세포로 하여금 내성을 가지게 하는 것으로 추정된다.

5. PqrA의 항체 제작

가. PqrA 단백질의 과발현 및 정제

pqrA 유전자의 coding region 1.2 kb 중 5' 쪽에서 0.6 kb deletion 된 0.6 kb 단편만을 PCR로 증폭시켜 pGEX-4T-1에 삽입하여 GST:PqrA fusion construct를 작성하여 pGEX-pqr0.6으로 명명하였다 (그림 2-17A). 이 재조합된 발현 vector는 *E. coli* JM109에 형질전환하여 30°C에서 배양한 후, IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다 (그림 2-17B). GST-PqrA fusion 단백질을 이용하여 유도하고자 한 이유는 *pqrA* 유전자 전체 1.2 kb 모두를 단백질 유도하고자 하였으나 예비실험 결과 1.2 kb 모두를 가지고 있을 때는 *E. coli*가 거의 성장하지 못하였을 뿐만 아니라 PqrA의 N-terminal로부터 순차적으로 deletion시킨 유전자 단편을 이용한 발현 실험에서도 *E. coli*가 성장하지 못하였다. 또한 발현 vector의 종류, IPTG의 농도, 배양시간 및 배양 온도 등 여러 조건을 변화시켜 발현을 유도하였으나 *pqrA*의 full length에 가까운 construct를 도입하였을 때에는 숙주균 *E. coli*의 성장이 억제되었다.

이와 같이 숙주균 *E. coli*가 성장하지 못하는 이유로는 *pqrA* 유전자가 지니고 있던 promoter 영역을 제거하고 개시 codon부터 발현 vector에 도입되었기 때문에 유전자의 발현이 *pqrA*가 가지고 있는 promoter에 의해 조절되는 것이 아니라 vector에 인위적으로 도입되어 있는 강력한 promoter에 의해 발현이 유도되기 때문인 것으로 추정되었다. 즉, *E. coli*에 대해 paraquat 내성을 부여하기 위해서는 최소량의 PqrA 단백질의 축적만으로도 충분하며 극단적으로 세포 내에 축적되었을 때는 오히려 세포의 막 구성 단백질들의 구성성분의 변화에 따른 물질 이동의 unbalance등에 의해 성장자체에 저해작용을 할 것으로 추정된다. 이러한 PqrA 단백질의 overexpression에

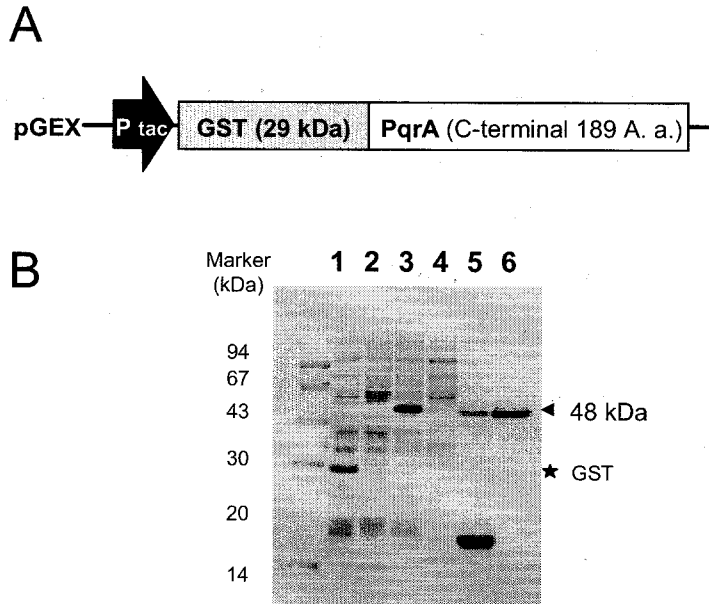


Fig. 2-17. Overexpression of GST-PqrA fusion protein in *E. coli*.

DNA fragment encoding the C-terminal part of PqrA protein was amplified by PCR with pBpq2.5 as a template. Oligonucleotides pqr5N and pqr3C were used as primers for the PCR amplification. PCR products were digested with *EcoRI* and *XhoI* and ligated into an expression vector pGEX4T-1. A. Expression vector, pGEX-pqr0.6. Plasmid DNA was introduced into *E. coli* JM109 and expression of the fusion protein was induced by IPTG. B. SDS-PAGE. Proteins were separated by 12% SDS-PAGE. Lane 1, *E. coli* cells containing pGEX4T-1, + IPTG; lane 2, total proteins from pGEX-pqrA0.6 cells, - IPTG; lane 3, total protein, pGEX-pqrA0.6, + IPTG; lane 4, soluble protein, pGEX-pqrA0.6, + IPTG; lane 5, insoluble protein, pGEX-pqrA0.6, + IPTG; lane 6, purified GST-PqrA fusion protein. Arrowhead and asterisk indicate GST-PqrA fusion protein of 48 kDa and GST (28 kDa), respectively.

따른 *E. coli*에 대한 독성을 없애고 안정적으로 PqrA 항원 단백질을 발현시키고자 GST와 fusion construct를 작성하여 단백질을 발현시켰다. 그림 2-17에서 나타난 바와 같이 pGEX-4T vector만을 IPTG로 발현하였을 때는 28 kDa의 GST 단백질만이 나타났으나, GST:PqrA fusion에서는 *pqrA*의 0.6 kb DNA단편에 coding 되어 있는 189 아미노산의 분자량이 추가된 48 kDa의 band가 관찰되었다. 발현된 단백질 추출액을 원심분리하여 soluble과 insoluble fraction으로 분리한 후 전기영동하여 확인한 결과, 발현된 단백질의 대부분이 insoluble fraction에서 나타났는데, 이는 발현된 GST-PqrA fusion protein이 inclusion body를 형성하기 때문이다. 단백질의 정제를 위하여 단백질 유도 후 inclusion body를 원심분리하여 모은 다음, TE buffer로 수 회 세정하고 항체 유도를 위한 재료로 이용하였다

나. 항체 제작 및 이중면역확산 분석

Polyclonal 항체를 유도하기 위하여 정제된 ORF1의 단백질 0.2 mg에 Complete Freund's adjuvant (sigma, USA)를 동량으로 첨가하여 잘 섞은 다음, 토끼의 피하에 주사하였다. 주사 후 2주 이후에는 매 2~3주 간격으로 Incomplete Freund's adjuvant (sigma, USA)를 사용하여 항체 생성이 확인 될 때까지 반복 주사하여 항체를 제작하였다.

이중면역확산 분석은 Ouchterlony와 Nilson (1986)의 방법으로 실시하였다. 0.9% agarose gel을 0.5×TBE buffer에 녹이고 직경 90 mm petri-dish에 20 ml씩 붓고 gel을 응고시킨 후, center에 1개의 well에 항체를 넣고 outer well 5개에 항원을 넣어 4°C에서 20시간 반응시킨 후 침강선을 확인하였다 (그림 2-18).

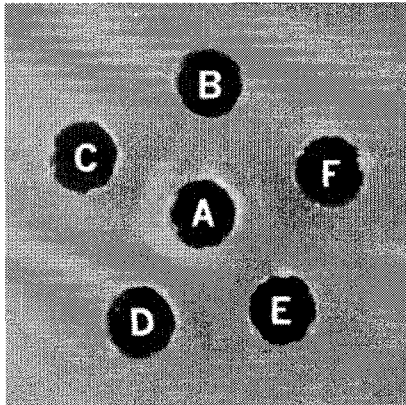


Fig. 2-18. Ouchterlony double immunodiffusion patterns of protein from the recombinant expression vectors.

The center well (A) contains antiserum against orf1 protein. the surrounding wells contain 0.5×TBE buffer (B), total protein induced from pGEX-pqr (C), purified pqr (D), total protein induced pGEX-4T-1 (E), and total protein from transgenic plants (F).

6. *pqrA* 유전자의 특성 해명

가. Southern blot 분석

분리된 paraquat 내성 유전자가 *O. anthropi* JW-2의 genome 유래의 것인지를 확인하고 genome 상에서의 copy 수를 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 실시하였다. Paraquat 내성유전자 *pqrA*의 0.9 kb *SalI* 단편을 probe로 하여 hybridization한 결과, 제한효소 *EcoRI*, *EcoRV* 및 *HindIII*로 절단한 genomic DNA에서 각각 1개의 hybridization band 만이 관찰되었다 (그림 2-19). 따라서, 분리된 *pqrA* 유전자가 *O. anthropi* JW-2 유래의 것임을 확인하였으며, genome 상에서 single copy로 존재한다는 것을 나타내었다.

나. Northern blot 분석

PqrA 유전자의 발현 양상을 조사하기 위하여 선발균 *O. anthropi* JW-2을 4시간 배양하고 paraquat을 0.1 mM 또는 10 mM의 농도로 첨가하여 6시간 더 배양한 후, total RNA를 분리하여 northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과, *pqrA* 유전자는 paraquat의 처리 유무 및 처리 농도에 따른 발현량의 차이를 나타내지 않았다 (그림 2-20). 이러한 결과로 미루어 보았을 때 *pqrA*는 paraquat에 의해 그 발현이 유도되는 유전자가 아니라 항상적으로 발현하는 유전자임을 알 수 있었다.

다. Immunoblot 분석

*PqrA*의 세포 내 존재 위치를 확인하기 위하여 *PqrA* 항체를 이용하여 immunoblot 분석을 실시하였다. 선발균 *O. anthropi* JW-2를 LB 배지에서 4시간 배양한 후,

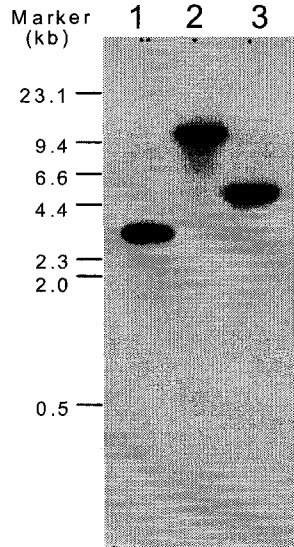


Fig. 2-19. Southern blot analysis of genomic DNA from *O. anthropi* JW-2.

Genomic DNA (5 μ g) was digested with *EcoRI* (lane 1), *EcoRV* (lane 2), or *HindIII* (lane 3) and separated on a 0.8% agarose gel. *SalI* fragment (0.9 kb) of *pqrA* gene was used as a hybridization probe.

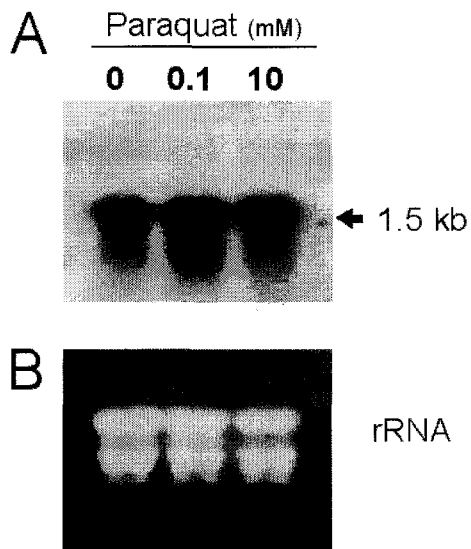


Fig. 2-20. Effect of paraquat concentration on expression of the *pqrA* gene in *O. anthropi* JW-2 cells.

A, Northern blot.

B, EtBr stained agarose gel after electrophoresis.

Cells were cultured in designated concentrations of paraquat for 6 h. Total RNA was extracted and separated by electrophoresis and then probed with *pqrA* specific probe.

paraquat 1 mM을 첨가하여 6시간 더 배양하여 균체를 회수한 다음, total protein 및 membrane vesicle을 분리하였다 (McMurry 법, 1980). 분리한 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 transfer 한 후, PqrA 항체를 이용하여 분석하였다. 분석 결과, PqrA 단백질 band는 soluble fraction에서는 관찰되지 않았고 insoluble fraction에서만 나타났으며 paraquat 처리 유무에 상관없이 발현량이 동일하였다 (그림 2-21). 이러한 결과는 northern blot 분석에서의 결과와 일치하는 것으로 PqrA는 세포 내에서 항상적으로 발현함을 나타내는 결과이다. 또한, PqrA가 membrane protein을 coding하는 유전자임을 뒷받침해 주는 것으로 PqrA의 paraquat에 대한 내성 기전이 PqrA에 의해 paraquat이 세포 내로 유입되는 것을 저해하거나 세포 내로 유입된 paraquat을 세포 밖으로 efflux 시키기 때문임을 의미하는 것으로 판단되었다.

7. *orf2* 및 *orf3*의 클로닝 및 DNA 염기서열 결정

Paraquat 내성유전자인 *pqrA*를 포함하는 pBpq2.5의 insert DNA의 크기는 2.5 kb였으며, 여기에는 3개의 ORF를 가지고 있음이 확인되었다. 이들 3개의 ORF가 paraquat 내성에 어떤 기능을 수행하는지를 확인하기 위하여 완전한 염기서열을 가지고 있는 *orf1* (*pqrA*) 이외에 *orf2*와 *orf3*의 완전한 clone을 선발한 다음, 그 염기서열을 분석하고 기능을 확인하고자 하였다.

가. Southern blot 분석

선발균인 *O. anthropi* JW-2로부터 분리한 genomic DNA를 여러 가지 제한효소로 완전 절단한 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel 상의 DNA를 nylon membrane으로 transfer하고, [α - 32 P] 로 표지한 *orf2* 유전자의 0.6 kb 단편과 *orf3* 유

전자의 0.6 kb의 단편을 각각 probe로 사용하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 그 결과, 제한효소 *SalI*으로 절단한 *O. anthropi*의 genomic DNA에서 *orf2*의 경우 1.8 kb의 hybridization band를 나타내었고 (그림 2-22A), *orf3*의 경우 1.2 kb의 hybridization band를 나타내었다 (그림 2-22B).

나. Genomic DNA library의 구축과 선발

O. anthropi JW-2로부터 분리한 genomic DNA를 제한효소 *SalI*으로 완전분해한 다음 0.5~4 kb 크기의 DNA 단편을 회수하여 pBluescriptII SK+ vector의 *SalI* 절단 부위에 도입하였다. 재조합된 plasmid DNA를 *E. coli* JM109에 형질전환한 다음, α -³²P] 로 표지한 *orf2* 유전자의 0.6 kb 단편과 *orf3* 유전자의 0.6 kb의 단편을 각각 probe로 사용하여 colony hybridization 방법으로 screening을 실시하였다. 그 결과, 선발된 클론으로부터 *orf2*의 경우 1.8 kb의 insert DNA 단편을 포함하는 pBpq1.8과 (그림 2-23, lane 1), *orf3*의 경우 1.2 kb의 insert DNA 단편을 포함하는 pBpq1.2 (그림 2-23, lane 2)를 선발하여 DNA 염기서열을 결정하였다.

다. *orf2*와 *orf3*의 DNA 염기서열 결정

선발된 *orf2*의 1.8 kb DNA 단편과 *orf3*의 1.2 kb DNA 단편의 DNA 염기서열을 결정하기 위하여 pBpq1.8과 pBpq1.2 DNA를 분리하여 제한효소로 이중절단한 다음, exonucleaseIII와 Mung-bean nuclease로 처리하여 nested-deletion mutants를 제작하였다. DNA 염기서열의 결정은 ALFexpress AutoRead Sequencing kit (Pharmacia, USA)와 ALFexpress DNA Sequencing System (Pharmacia, USA)을 이용하였다.

orf2 유전자를 포함하는 1.8 kb 단편의 DNA 염기서열을 결정하여 분석한 결과, *orf2*의 완전한 ORF의 크기는 ATG 개시코돈으로부터 종결코돈인 TGA까지 969 bp였

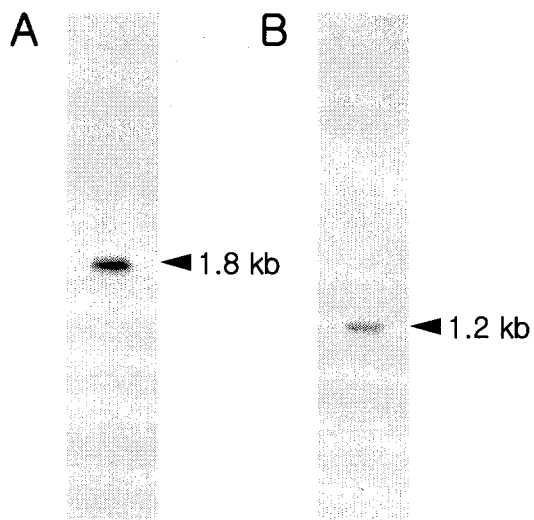


Fig. 2-22. Southern blot analysis of genomic DNA from *O. anthropi* JW-2.

Genomic DNA (5 μ g) was digested with *Sa*I and separated on a 0.8% agarose gel. [α - 32 P] labeled 0.6 kb *orf2* (A) or *orf3* (B) fragment was used as a hybridization probe, respectively.

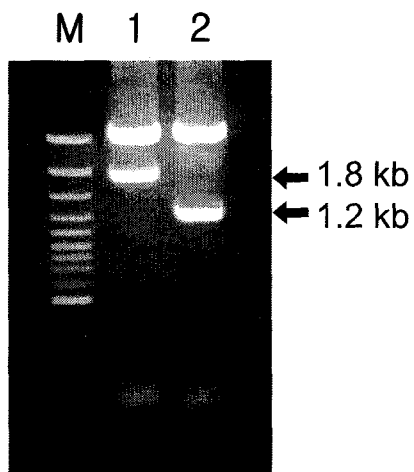


Fig. 2-23. Restriction enzyme analysis of plasmid pBpq1.8 and pBpq1.2.

pBpq1.8 (lane 1) and pBpq1.2 (lane 2) DNA was digested with *Sa*II, and separated on a 0.8% agarose gel. Arrow indicates insert DNA. M, 100 bp DNA ladder size marker.

다 (그림 2-24). *orf2*로부터 추정되는 아미노산의 수는 323개였으며 추정되는 예상분자량은 36,039 Da이었다. 그리고 *orf2* 유전자는 *pqrA* 유전자의 3' 쪽에 위치하며 *pqrA* 유전자의 방향과 반대방향으로 coding되어 있었다. 결정된 *orf2*의 아미노산 서열을 이용하여 상동성 검색을 실시한 결과, *orf2*는 미생물 유래의 transcriptional regulator 단백질인 YWB1 (*B. subtilis*의 전사조절인자), OxyR (*E. coli*의 hydrogen peroxide-inducible 유전자의 regulator) 및 LysR (*E. coli*의 전사조절 단백질)과 각각 47%, 45% 및 39%의 상동성을 나타내었다 (그림 2-25). 따라서, *orf2* 유전자는 *O. anthropi* JW-2에서 paraquat 내성유전자 (*pqrA*)의 발현을 조절하는 전사조절인자를 암호화하는 것으로 추정되어 이 유전자를 *pqrR1*으로 명명하였다.

orf3 유전자를 포함하는 1.2 kb 단편의 DNA 염기서열을 결정하여 분석한 결과, *orf3*의 완전한 ORF 크기는 ATG 개시코돈으로부터 종결코돈인 TGA까지 618 bp였다 (Fig 2-26). *orf3*로부터 추정되는 아미노산의 수는 206개였으며, 추정되는 예상분자량은 22,429 Da이었다. 그리고, *orf3* 유전자는 *pqrA* 유전자의 상류에서 *pqrA* 유전자의 방향과 반대방향으로 즉, *orf2*와 동일한 방향으로 coding되어 있었다. 결정된 *orf3*의 아미노산 서열을 이용하여 상동성 검색을 실시한 결과, *orf2*와 마찬가지로 *orf3*도 미생물 유래의 transcriptional regulator 단백질인 TetR (*Mycobacterium tuberculosis*의 전사조절인자) 및 PA2270 (*Pseudomonas aeruginosa*의 전사조절인자)과 높은 상동성을 나타내었다 (그림 2-27). 따라서, *orf3* 유전자 역시 *O. anthropi* JW-2에서 paraquat 내성유전자 (*pqrA*)의 발현을 조절하는 전사조절인자를 암호화하는 것으로 추정되어 이 유전자를 *pqrR2*로 명명하였다.

이와 같이 *pqrR1* (*orf2*)과 *pqrR2* (*orf3*)의 DNA 염기서열 및 아미노산 서열을 분석한 결과, 이들 유전자 산물은 환경 스트레스 및 약제 내성 관련 유전자들의 전사조절인자들과 높은 상동성을 나타냄으로써 *O. anthropi* JW-2 내에서 *pqrA* 유전자의 발현조절에 관여하는 것으로 추정되어 그 기능을 분석하였다.

```

1  AACCGCAAAAACCTGCGGTGGCGGCAATCGCAGCAGCGGCAATGAAACCCGTGAATTTGTT 60
61  AAACATGCTGTTCCCGACTTCCTCTTGTGTTTTGTTTTCTTGAGGCTATTTGATGCCTCCCA 120
121  ATTTTCATGATTGCTTTTATGGATGCATTTGCGAAATAGATAATCGGAATGGATTGCATA 180
181  GATTTTCATGAATGGATAAAGCCATGTCGCTGCACCGCCCCGAGCGCCTTGTCTGGGATCT 240
      M D K A M S L H R P E R L V W D L
241  GGA CTGGAACCTTCTGCGCAGTTTTGTGGTGATTGCTGAAGTGAAAAGCATCACCCGCGC 300
      D W N L L R S F V V I A E V K S I T R A
301  TGC GGAACGGCTCAATCTCAAGCAACCAAGTGTGAGCAATGCGCTGCGCCGGCTGGAAGA 360
      A E R L N L K Q P S V S N A L R R L E D
361  CCG CATCGCCAGCGACTGGTGGAGCGTGACGCCACCCATTTGAGCTGACCGAAGTCGG 420
      R I G Q R L V E R D A T H F E L T E V G
421  TAA ACTGCTCTATGAACAGAGCATCGACGTCTTCGGCGCTATTTGCGAACTGCCGAGCT 480
      K L L Y E Q S I D V F G A I S Q L P Q L
481  TGT GCGTGGGGTGGTGACGATGTCACCGGCCATGTCACCATATCGGTGGCCAGTCACAT 540
      V R G V G D D V T G H V T I S V A S H I
541  TGT TTCGCGGATCTTCGACCGGGCAGTTGAGCTTTTTTCATGAACAGCATCCGCGAGCGAC 600
      V S P I F D R A L E L F H E Q H P R A T
601  GCT GACAATCAATGTTTCCGCCAGCACCGAAGTTGCTCGACTGGTTTCGAGAGAAGCGCGC 660
      L T I N V S A S T E V A R L V R E K R A
661  TTCT TTCGCTCTGGGCTGGTGGAGCAATCGTGATCCGGCGCTCGACTACCCATGGTCTA 720
      S F G L G L V S N R D P A L D Y T M V Y
721  TCG TGAATCTTCGGCTTTTTCTGCGGGCCCCGGCACCGGATGTTTCGGCCAGTCCGGACT 780
      R E F F G F F C G P R H R M F G Q S G L
781  GAC GCTTGGCGATCTGAAGGGAGAACCCTCGGTTTCATTCCAGACCGACCACATTGCTGA 840
      T L A D L K G E P S V S F Q T D H I A D
841  CGC GCTGCGCCCGGTAGCTCTGCTGCGCAGTGAGGCGCGGCTTTACCGGATGTCGTCGG 900
      A L R P V A L L R S E A R L S P D V V G
901  CAC CTGTCGAGCCTTGAAGAAGTGCGCCGGATGATCATTACCGCCTTGGCATCGGTCC 960
      T S S S L E E V R R M I I T G L G I G P
961  GCT TCCGCTGCACGTGGCGGACGCGAGATTGATGACGGCCTTCTCTGGCGTTTGCCGCC 1020
      L P L H V A R R E I D D G L L W R L P P
1021  TTAC GACAACCCGCCCGCCATCGATGTTTTCTGATCCACAATCCGGAAACCAATCTCAA 1080
      Y D N P P A I D V F L I H N P E T N L N
1081  CAAG CCGGAGAAAGCCATGCTGGCCGGATTGAAGGGATTGATCGCTTCCACACCGCTGGA 1140
      K A E K A M L A G L K G L I A S T P L E
1141  AAAC CGTATTTACGGAGATTGACGAGCGGGCCTTACCCGCTCGTCCCTATCTAGCTACTC 1200
      N R I Y G D *

```

Fig. 2-24. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *pqrR1* gene in *O. anthropi* *JW-2*. Nucleotide is numbered from 5'-end.

- Helix - Turn - Helix -			
PqrR	1	MDKAMSLHRPERLVWOLDWNLLRSFVVI AEVKSI TRAAERLNLKQPSVSNALRRLEDRI G	60
OxyR	1	M-----N--IR---DLE--YLVA-LAEHRHFRRRA-A-DSCHVSQPTLSGQIRKLEDELG	44
LysR	1	M--A-AVN--LR---HIE--IFHA-VMTAGSLTEA-A-HLLHTSQPTVSRELARFEKVI G	47
YWB1	1	-----MDIRHLTYFLEVARLKSF TKASQSLYVSQPTISKMIKNLEEELG	44
		* . . . ** . *	
PqrR	61	QRLVERDATHFELTEVGKLLYEQSIDVFGAISQLPQLVRGVGDDVTGHVTISVASHIVSP	120
OxyR	45	VMLLERTSRKVLFTQAGMLLDVQARTVLRVVKVKEMASQQGETMSGPLHIGL IPTVGPY	104
LysR	48	LKLFERVRGRHLHPTVQGLRLEFEEVQRSWYGLDRIVSAAESLREFRQGELSIACL PVFSQS	107
YWB1	45	IELFYRNGRQVELTDAGHSMYVQAQEI KSFQNL TSELNDIMEVKKGHVRI GLPPMIGSG	104
		* * * * *	
PqrR	121	IFDRALELFHEQHPRATLTINVSASTEVARLVREKRASFGLGLVSNRDPALD-YTMVYRE	179
OxyR	105	LLPHIIPMLHQTFPKLEMYLHEAQTHQLLAQ-LDSGKLD CVI LALVKESERFIEVPLFDE	163
LysR	108	FLPQLLQPF LARYPOVSLNI-VPQESPLLEEWLSAQRHDLGLTETLHTPAGTERTELLSL	166
YWB1	105	FFPRVLGDFRENYPNVTFQLVEDGSIKVQEGVGDGSLDI GVVVLPANEDI FHSFTIV-KE	163
		*	
PqrR	180	FFGFFCGPRHRMFGQSGLTLADLKGEPVSFQTDHIADALRPVALLRSEARLSPDVVGT S	239
OxyR	164	PMLLAIYEDHPWANRECVP MADLAGEKLLMLEDGHCLRDQAMGFCFEAGADETHFRATS	223
LysR	167	DEVCVLPPGHPLAVKKVLT PDDFQGENYISLSRTDSYRQLLDQLFTEHQVKRRMIVETHS	226
YWB1	164	TLMLVVHPSHRLADEKECQLRELKDEPFI FFREDFVLHN-R-IMTECIKAGFRPHIYET	221
		* . . . *	
PqrR	240	SSLEEVRRMIITGLGIGPLPLHVARREIDDGLLWRLPPYDNPPAIDVFLIHNPETNLNKA	299
OxyR	224	LETLRNMVAAGSGITLLPALAVPPERKRQGVV-YLPCIKPEPRRTIGLVYRPGSPLRSRY	282
LysR	227	AASVCAMVRAGVGISVVNPLTALDYAASGLVVRRFSAVPFTVSLIRPLHRPSSALVQAF	286
YWB1	222	SQWDFISEMVSANLGI GLLPERIC-RGLDPEKVKVIPLVDPVIPWHLAIIWRKDRYLSFA	280
		* . . . *	
PqrR	300	EKAMLAGLKGLIASTPLENRIYGD--	323
OxyR	283	-EQLAEAIRARMDGHFDKVLKQAV--	305
LysR	287	SGHLQAGL-PKLVTSLDAI LSSATTA	311
YWB1	281	ARAWLEHTKSYL-WDPKKDSK-G---	301

Fig. 2-25. Comparison of amino acid sequences of PqrR1 with other proteins.

The helix-turn-helix motif is uplined. OxyR, hydrogen peroxide-inducible genes regulator; LysR, transcriptional regulatory protein of *E. coli*; YWB1, transcriptional regulatory protein of *B. subtilis*.

1 ATGCAAATAAAAGGAACATGATGCGTAAACCCGGAAGCGAAATGATTGCTGAAACGAGGACGAAAGCTGTTGGCTCGGGGCCCAAGGCTTTTGGGA 96
M Q I K G T M M R K P R S E M I A E T R T K L L A A G R K A F G

97 AACGTTGGTTATGCCGAAGCTTCGATGGATGATTTTACCGCCCTCCGCCGGATTGACACGGCGCGCTCTATCATCATTTCGGTGACAAGAAGGGC 192
N V G Y A E A S M D D F T A S A G L T R G A L Y H H F G D K K G

193 CTTCTGCAGGCCGTGATCAACGAAATTGATTGCGAGATGGCCGCGAGATTGTGCATGATTTCTGCCAAAGCGCCGACCCTGGCAGGGGTTTGTG 288
L L Q A V I N E I D C E M A A R L C M I S A K A P D R W Q G F V

289 GAAGAGAATACGGCTTATATCGAGATGGCGCTCGAACCGGAAATCCAGCGGATCATGTTTCGCGACGGGCGCGGTTTTTCGGCGATCCGTCCAGT 384
E E N T A Y I E M A L E P E I Q R I M F R D G P A V F G D P S S

385 TGGCCGAGTGCCAACGGCTGTATCCGCGACGATCACCACAGGTCTCGACGCCCTACGAAAAGATGGTGTATTGTTGATATTGACCCGGAAGCCGCC 480
W P S A N G C I R T I T T G L D A L R K D G V I V D I D P E A A

481 GCGCGGCTGATCAATGCGGCGAGCAGTGTGCGGCACAATGGATTGCCAATTCAGACGATCCGGAAACCACATCGAAGAGGGCGGTCAAGGCGTTC 576
A R L I N A A S S A A A Q W I A N S D D P E T T S K R A V K A F

577 CGGACGTTTCTGGAAGGTCTGCTGATCCGGCAGGAAAAGTGAAGTCAGTCCCTGACCCTTTCGCGAATAGCTGCAACCAGTCTTTCGGGGTCAAT 672
R T F L E G L L I R Q E K *

673 CGGCTTGTGCAGCAGCAGATAGCCGCTGCCAGATGCCTCGCAAGTCTTTCGGCGAGGTATCGCCTGTGAGGATGATCACCGGCAAGGCCGCTT 768

769 CAGCAGAGCGAATATTTCCGCCGACGCTTCTGTTCCGGTCGCTGGCCTTGAACCGATAATCCACGATCAACAGATCTGGCTCCCGCCACTTC 864

865 AGATGTCTGATAGGATCGATAGGCCGCCGAGT 897

Fig. 2-26. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *pqrR2* gene in *O. anthropi JW-2*. Nucleotide is numbered from 5'-end.

8. Paraquat 내성유전자 영역의 확인 및 발현조절 기구

Ochrobactrum anthropi JW-2로부터 분리한 paraquat 내성 관련 유전자인 *pqrA* (*orf1*), *pqrR1* (*orf2*), *pqrR2* (*orf3*) 및 관련 sequences가 paraquat 내성 획득에 있어 어떤 역할을 수행하는지를 확인하기 위하여 각각의 유전자, 유전자 조합 및 deleted-sequences로 구성된 constructs를 구축하여 *E. coli*에 형질전환한 다음, paraquat 처리 후 성장률을 조사하였다.

가. Constructs의 구축

Ochrobactrum anthropi JW-2의 paraquat 내성 관련 유전자인 *pqrA*, *pqrR1* 및 *pqrR2*를 포함하는 3.9 kb의 genomic DNA 단편을 주형으로 이용하여 제한효소 분해 및 PCR 증폭을 실시하여 각각의 유전자, 유전자 조합 및 deleted-sequences로 구성된 mutant clone을 만든 다음, pBluescriptII SK+ vector 내의 *lacZ* promoter 하류에 정 방향으로 도입하여 다음과 같은 construct를 구축하였다 (그림 2-28A). 이때 대조구로는 pBluescriptII SK+ vector만 도입한 construct C를 사용하였으며, 구축된 각각의 constructs를 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하여 성장률의 조사에 이용하였다.

나. Paraquat 내성유전자 영역의 확인 및 발현조절 기구

각각의 construct로 형질전환된 clone의 colony를 5 ml의 LB 배지에 접종하여 하룻밤 배양하였다. 배양액 50 μ l를 5 ml의 LB 배지에 다시 접종한 후, paraquat을 최종농도 0.5 mM의 농도로 첨가하여, 37°C에서 48시간 배양하면서 12시간 단위로 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 성장정도를 조사하였다.

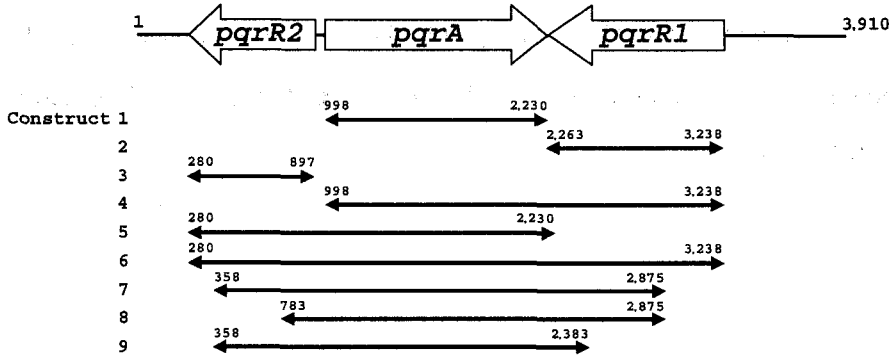
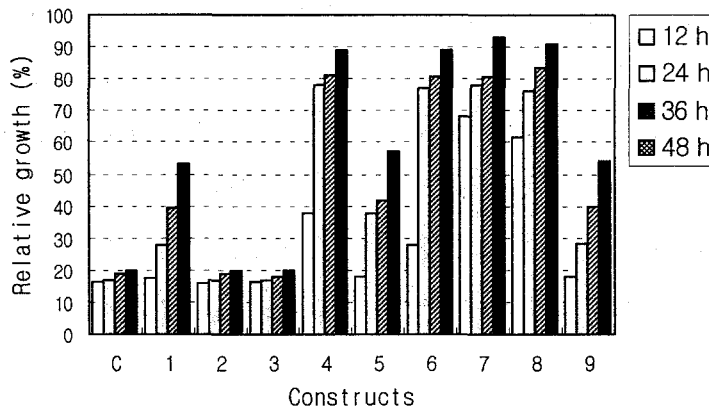
A**B**

Fig. 2-28. Effect of overexpression of *pqr*-mutant clone on growth of *E. coli*.

A, Construction of *pqr*-mutant clone. Each mutant clone was placed under the control of *lacZ* promoter in pBluescriptII SK+ vector. B, *E. coli* DH5 α cells transformed with each plasmid were cultured for 48 h in LB medium containing 0.5 mM paraquat. Optical density of each culture was measured at 660 nm.

이때 성장정도는 paraquat이 첨가되지 않았을 때 (0 mM)의 값을 100으로 하였을 때에 대한 상대성장률로 나타내었다 (그림 2-28B).

Paraquat 처리구의 상대성장률을 확인한 결과, 대조구로 이용한 pBluescript II SK+ vector만 도입된 construct C는 배양시간에 관계없이 17~20%의 상대성장률을 나타내었다. Construct 1~9로 형질전환된 *E. coli*의 상대성장률을 조사한 결과, 크게 3 그룹으로 구분되었다. 즉, *pqrR1*과 *pqrR2* 만을 각각 가지고 있는 construct 2와 3의 경우도 대조구인 construct C와 비슷하게 20% 정도의 상대성장률을 나타내어 paraquat에 대해 전혀 내성을 나타내지 않았다.

pqrA 유전자만을 가지고 있는 construct 1은 초기성장률은 낮았으나, 배양시간이 경과함에 따라 최대 53% (48 시간)의 상대성장률을 나타내었다. 또한 *pqrA* 유전자에 *pqrR2*의 full-length를 포함하는 construct 5와 *pqrA* 유전자에 *pqrR1* 및 *pqrR2*의 partial sequence를 포함하는 construct 9는 *pqrA* 유전자만을 가지고 있는 construct 1과 유사한 성장률을 나타내었다. 이들 construct 1, 5 및 9의 경우, 12시간에서의 상대성장률은 대조구인 construct C와 유사하였으나, 배양시간이 경과함에 따라 상대성장률이 증가하여 배양 48시간에는 53~56%의 상대성장률을 나타내었다.

Construct 4, 6, 7 및 8의 경우 가장 높은 상대성장률을 나타내었다. 즉, 이들 construct로 형질전환된 *E. coli*는 배양 12시간에서의 상대성장률은 28~66%로 다양한 양상을 나타내었으나, 배양 24~36시간의 상대성장률은 76~83%로 매우 유사하게 증가하였으며, 최종적으로 배양 48시간에는 paraquat 무첨가구의 89~94%까지 성장하여 paraquat에 대한 높은 내성을 나타내었다.

이와 같은 construct 별 상대성장률을 비교한 결과, *pqrR1* 및 *pqrR2* 산물은 paraquat 내성과는 직접적인 연관성이 없으며, *pqrA* 산물이 paraquat 내성에 직접 관여하는 것으로 판단되었다. 또한, paraquat 첨가시 가장 높은 상대성장률을 나타낸 construct 4, 6, 7, 8과 중간정도의 상대성장률을 나타낸 construct 1, 5, 9의 차이를 조사한 결과, *pqrR1*의 partial sequence (2,383~2,875 bp)의 존재 유무에 따라 내성의

획득 정도에 차이가 있는 것으로 조사되었다. 즉, *pqrA*를 포함하지만 *pqrR1*의 partial sequence (2,383~2,875 bp)를 포함하지 않는 construct 1, 5, 9는 paraquat 첨가시 초기성장이 억제되었다가 배양시간이 경과함에 따라 상대성장률이 53~56%까지 성장하였다. 반면에 *pqrA*와 *pqrR1*의 partial sequence를 포함하는 모든 constructs (4, 6, 7, 8)는 0.5 mM의 paraquat 농도에서도 paraquat 무첨가구와 비교하여 89~94%까지 성장하여 paraquat에 대한 높은 내성을 나타내었다. 따라서, *pqrA* 유전자의 발현 조절에는 *pqrR1* 및 *pqrR2* 유전자가 직접 관여하지 않고, *pqrR1*의 partial sequence (2,383~2,875 bp)가 *pqrA* 유전자의 항상적인 발현과 이를 통한 paraquat 내성 획득에 있어 enhancer sequence로서의 기능을 수행하는 것으로 추정되었다.

제4절 Paraquat 내성목초의 개발

1. *pqrA* 유전자의 담배로의 도입 및 내성 확인

가. *pqrA* 유전자의 발현 vector로의 도입

pqrA 유전자의 식물체 도입을 위한 binary vector로는 pGA748을 이용하였다. pBpq2.5 DNA를 제한효소 *Hind*III로 절단하여 *pqrA* 유전자를 포함하는 2.1 kb의 DNA 단편을 회수한 다음, pGA748의 *Hind*III 절단부위에 도입하였다 (그림 2-29). 재조합된 vector는 *E. coli* HB101에 형질전환하여 kanamycin (50 μ g/ml)이 첨가된 LB 배지에서 배양하여 형질전환된 colony를 선별하였다. Plasmid DNA를 분리하여 제한효소 분해 후 전기영동하여 *pqrA* 유전자가 CaMV 35S promoter의 하류에 도입되었는지와 도입된 방향을 확인하였다. 재조합된 construct를 pGApqr2.1로 명명하고, Horsch 등 (1988)의 freeze-thaw 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환하였다. 형질전환된 *Agrobacterium*으로부터 plasmid DNA를 분리하여 제한효소 분해 및 PCR 증폭으로 발현 vector의 도입여부를 확인한 다음, 식물체 형질전환에 이용하였다.

나. 모델식물의 형질전환

pGApqr2.1로 형질전환된 *A. tumefaciens* LBA4404를 kanamycin과 rifampicin이 첨가된 YEP 배지에 접종하여 하룻밤 배양한 후, Horsch 등 (1988)의 leaf disc transformation 방법으로 식물체를 형질전환하였다 (그림 2-30). 기내에서 무균배양한 담배의 잎을 0.5×0.5 cm 크기로 잘라 *A. tumefaciens* LBA4404 현탁액에 감염시킨 다음, MS 배지에 치상하여 28℃, 암상태에서 이틀간 배양하였다. 멸균수로 엽조각을 수

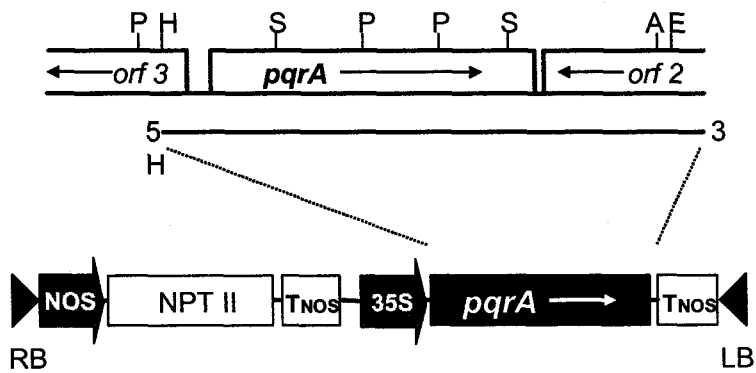


Fig. 2-29. Construction of the expression vector, pGApqr2.1 introduced into tobacco plants.

The *Hind*III fragment of 2.1 kb was placed under the control of the CaMV 35S promoter. Restriction sites of *Pst*I (P), *Hind*III (H), *Sal*I (S), *Eco*RI (E), and *Apa*I (A) are shown.

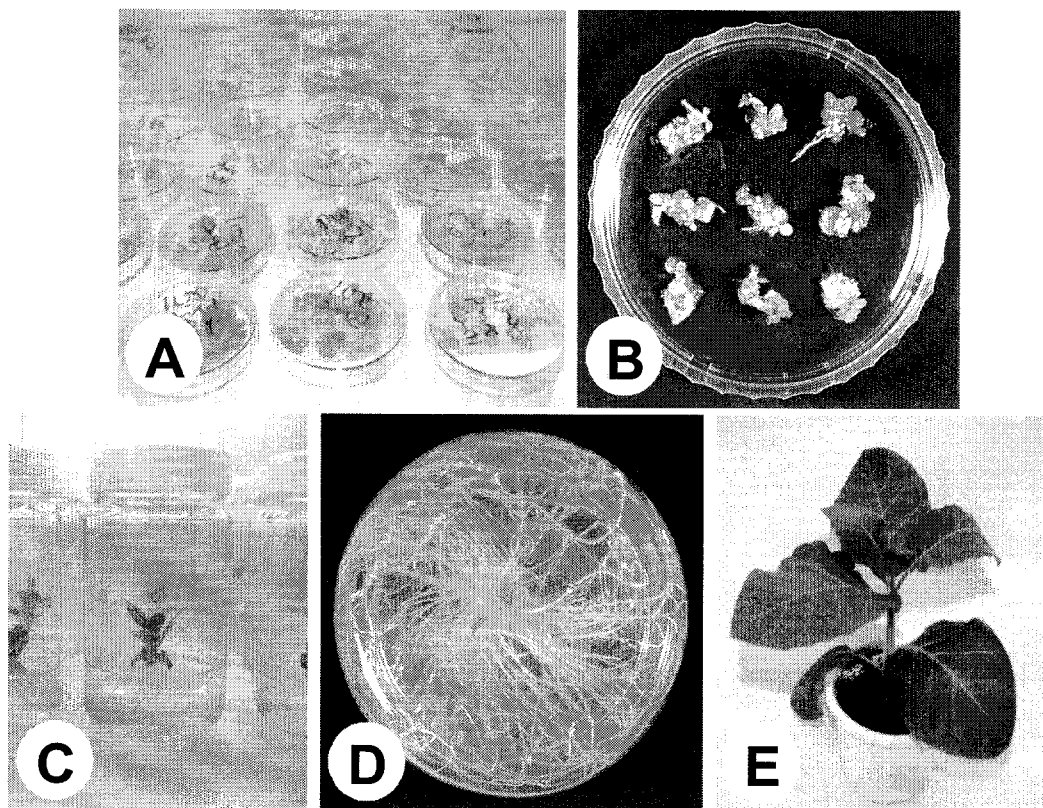


Fig. 2-30. Production of transgenic tobacco plant.

A and B, Shoot formation on the selection medium. C and D, Roots induced in the medium containing kanamycin. E, Transgenic tobacco plant cultivated in the pot for 5 weeks.

회 세척한 후, 1 mg/ℓ의 BAP, 0.1 mg/ℓ의 NAA, 100 μg/ml의 cefotaxime 및 100 μg/ml의 kanamycin이 첨가된 MS 배지로 옮겨 shoot의 분화를 유도하였다. 유도된 shoot를 micro nutrient의 양을 1/2로 줄이고 kanamycin과 cefotaxime이 첨가된 MS 배지로 옮겨 뿌리를 유도하여 정상적인 식물체로 분화시켰다. 기내에서 잎과 뿌리가 완전히 형성된 식물체를 원예용 상토 (5호, 부농)를 담은 화분으로 옮긴 다음, 수분을 충분히 공급한 상태에서 랩으로 봉하여 일주일간 순화시켰다. 이때 형질전환된 식물체는 형질전환 시에 빈번하게 나타나는 것으로 알려진 위조현상과 같은 표현형상의 뚜렷한 변이는 나타내지 않았다.

다. 형질전환 식물체의 선발 및 homozygous line의 확립

형질전환된 식물체의 genome에 *pqrA* 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여, 재분화된 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 Southern blot 분석으로 확인하였다. Genomic DNA를 제한효소 *HindIII*로 완전분해한 다음, agarose gel 전기영동하여 nylon membrane에 transfer하였다. Hybridization probe로 방사능 표지된 2.1 kb *pqrA* 유전자 단편을 사용하여 분석한 결과, 형질전환되지 않은 wild-type 담배에서는 *pqrA* probe와 hybridization하는 band가 전혀 나타나지 않았으나, 형질전환된 모든 개체의 genomic DNA에서는 예상크기와 동일한 2.1 kb의 hybridization band가 관찰되었다 (그림 2-31). 따라서, 형질전환 담배의 모든 개체에 *pqrA* 유전자가 안정적으로 도입되었음을 확인하였으며, 22개체의 형질전환 담배 (T_0 plant)를 선발하였다.

형질전환이 확인된 22개체 (T_0)로부터 자가수정을 통하여 형태학적으로 정상이고 종자가 정상적으로 결실되는 총 12 line을 선발한 다음, 이들로부터 T_1 종자를 채종하였다. 선발된 T_1 종자는 200 μg/ml의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 파종하여 kanamycin 내성 개체와 감수성 개체의 분리비를 확인한 결과 모든 개체가 3:1의 분리비를 나타내었다. 또한, 형질전환 식물체로부터 분리한 genomic DNA를 도입한 발현

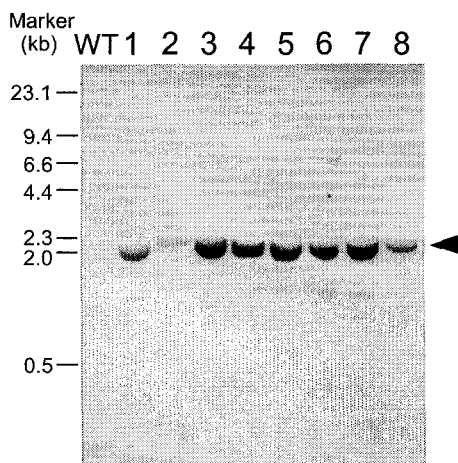


Fig. 2-31. Southern blot analysis of genomic DNA of transgenic tobacco plants.

Genomic DNA (20 μ g) from wild-type (WT) and transgenic plant was digested with *Hind*III and separated on 0.8% agarose gel. The *Hind*III fragment prepared from pBpq2.5 was used as a hybridization probe. Numbers indicate independent transgenic lines. Arrowhead indicates *pqrA* gene.

vector 내에 존재하지 않는 제한 효소로 절단하여 Southern blot 분석으로 확인한 결과, 각각의 line에서 1개의 hybridization band가 확인되었다 (data not shown). 이러한 결과들로부터 *pqrA* 유전자가 담배의 genome에 1 copy씩 도입되었음을 확인하였다. 유전적으로 균일한 homozygous line을 확립하고자 이들 kanamycin 내성 개체 중 성장이 비교적 빠른 내성 식물체를 각 line 별로 5개체씩 pot에 이식한 후 자가수정을 통하여 T₂ 종자를 채종하였다. T₂ 종자를 다시 200 µg/ml의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 파종하여 kanamycin에 의해 고사하는 개체가 하나도 없는 line을 선발하였다. 이와 같은 과정을 통하여 12 line 각각에 대한 T₂ homozygous line을 확립하였다.

라. 형질전환 식물체에서의 *pqrA* 유전자의 발현

1) Northern blot 분석

형질전환된 식물체 내에서 *pqrA* 유전자의 발현 여부와 발현량을 확인하기 위하여 homozygous 형질전환체로 확인된 12 line에 대하여 northern blot 분석을 실시하였다. 형질전환된 12 line에 대한 northern 분석 결과, wild-type에서는 *pqrA* transcript가 전혀 나타나지 않았으나, 형질전환된 대부분의 line에서 *pqrA* transcript가 축적되었음을 확인하였다 (그림 2-32A). 따라서, 도입된 *pqrA* 유전자가 형질전환 식물체 내에서 항상적으로 발현되고 있음을 확인하였다. 반면 각각의 형질전환 식물에 있어서의 *pqrA* transcript의 발현량에는 차이가 있음을 확인하였다. 형질전환 식물체 7, 16 및 20은 비교적 높은 발현량을 보였으며, 4, 8, 9, 12 및 13은 중간정도의 발현량을 그리고 1, 10, 11 및 15는 발현량이 낮거나 transcript의 크기가 shift된 것들이 관찰되었다. 이와 같이 형질전환 식물체 내에서 도입된 외래의 유전자가 발현량에 차이를 나타내는 것은 positioning effect (Kuhlemeier 등, 1987), co-suppression (Napoli 등, 1990), T-DNA insertion mutation (Feldman, 1991), gene dosage effects (homo- versus

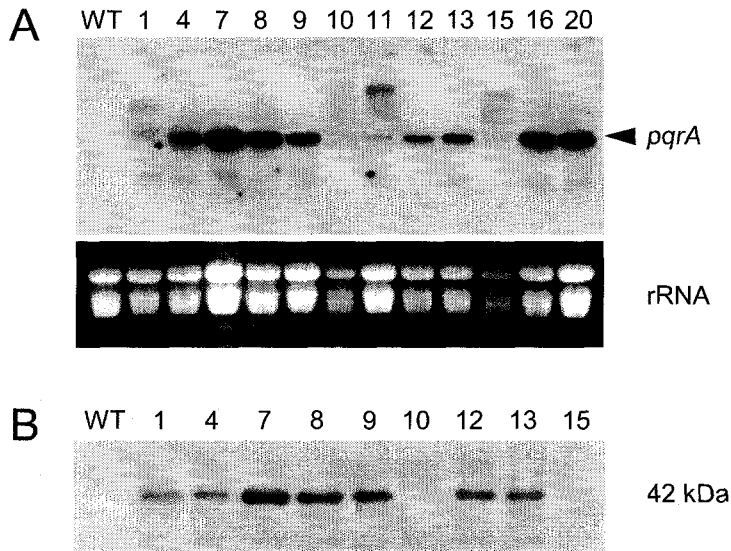


Fig. 2-32. Expression of *pqrA* gene in transgenic tobacco plants.

A, Northern blot analysis. Total RNA was extracted from leaves of wild-type plant (WT) and transgenic plants. Total RNA (20 μg) was fractionated by electrophoresis and probed with *pqrA* specific probe. Numbers indicate independent transgenic lines. B, Immunoblot analysis. Membrane proteins were prepared from wild-type (WT) and transgenic plants. After SDS-PAGE, proteins were blotted onto nitrocellulose membrane and analyzed by immunoblotting. Rabbit antiserum against a GST-PqrA fusion protein was used at a dilution of 1:2000. Each lane contains 30 μg of protein. Arrowhead indicates PqrA protein.

heterozygous individuals) 및 somaclonal variation (Larkin과 Scowcroft, 1981) 등에 기인하는 것으로 알려져 있다. 그리고 형질전환 식물체 중 1, 11 및 15에서 나타난, *pqrA* 유전자의 크기보다 큰 transcript가 나타나는 현상은 발현 vector가 도입된 genome 상에서 상류영역에 존재하는 promoter에 의해 전사된 산물일 것으로 추정된다.

2) Immunoblot 분석

미생물 유래의 *pqrA* 유전자가 식물에 도입되었을 때 정상적으로 단백질로 번역되는지를 확인하기 위하여, northern blot 분석에서 발현량이 서로 다르게 나타난 9개의 line에 대해서 PqrA 항체를 이용하여 immunoblot 분석을 실시하였다. 형질전환된 담배의 잎으로부터 total 단백질 및 membrane vesicle fraction을 분리하고 단백질량을 측정하여 다음 lane당 30 μ g의 단백질을 loading하고 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 하였다. 전기영동한 gel은 nitrocellulose membrane에 transfer한 다음, PqrA 항체로 일차 반응을 시키고, 이차항체 (AP-conjugated goat anti-rabbit IgG)를 이용하여 발색시켰다. 그 결과, 형질전환하지 않은 wild-type의 membrane fraction에서는 PqrA 항체와 반응하는 band가 관찰되지 않았으나, 대부분의 형질전환 식물체로부터 분리한 membrane fraction에서는 PqrA 단백질 band로 추정되는 분자량 약 42 kDa의 band가 관찰되었다 (그림 2-32B). 한편, 항원 단백질로 이용하기 위하여 fusion 단백질의 N-terminal 쪽에 사용되었던 GST의 분자량인 29 kDa의 크기를 가지는 band는 전혀 관찰되지 않았다. 즉, fusion 단백질에 사용되었던 pGEX-4T vector의 GST에 대한 항체는 담배가 가지는 GST를 인식하지 못하는 것으로 추정된다. 따라서, 이와 같이 GST와는 분자량적으로 완전히 구별된다는 점과 더불어 *pqrA* 유전자로부터 추측되는 410개의 아미노산으로부터 추정되는 예상 분자량과 일치하는 점 등으로 미루어 그림 2-32B에서 관찰된 42 kDa band는 도입된 유전자인 *pqrA*의 번역산물로 판단

되었다. 한편 형질전환 식물체로부터 분리한 soluble protein fraction에서는 PqrA 단백질 band를 확인하기 어려웠는데, 이러한 결과는 PqrA 단백질이 integral membrane 단백질이기 때문인 것으로 판단된다. 즉, 식물에서 발현된 PqrA 단백질은 아직 밝혀지지 않은 경로를 통하여 식물 세포의 세포막 또는 각 organelle의 membrane에 targeting되었을 가능성을 나타내는 것으로 선발균인 *O. anthropi* JW-2에 대한 immunoblot 분석에서도 membrane fraction에서 *pqrA* 유전자 산물이 확인된 결과와 완전히 일치한다 (그림 2-21). 따라서, 미생물 유래의 paraquat 내성유전자인 *pqrA*는 식물체 내에서도 정상적으로 발현, 번역 될 뿐만 아니라 *O. anthropi* JW-2에서와 같이 그 단백질이 paraquat 내성 부여에 기능하기 위한 전제 조건인 membrane으로의 localization이 일어나고 있음을 나타낸다. 한편, 형질전환 식물체에 있어서 PqrA 단백질의 축적량은 *pqrA* transcript의 축적량과 거의 일치하게 증감하였다 (그림 2-32). 그러나 전반적으로는 PqrA 단백질의 축적량 자체는 그다지 높지 않아서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동시 loading한 단백질량 (30 $\mu\text{g}/\text{lane}$)에 비해 항체와 반응하는 단백질 양은 적었다. 그 원인으로서는 도입된 *pqrA* 유전자 산물의 기능이 ion pump 내지는 efflux 기능을 한다는 관점에서 보았을 때, 이 단백질의 세포막에서의 과다한 축적은 세포에 negative 요인 즉, 세포 내의 ion balance의 파괴, 막을 통한 물질수송 저해 등으로 작용하여 생장에 오히려 해를 주어 실제로 발현량이 높은 형질전환 식물체가 완전한 식물체로 재분화되지 못하였을 가능성이 높다. 이를 뒷바침하는 결과가 *E. coli*에서의 과발현 실험에서도 관찰되었다. 즉, *pqrA* 유전자의 full-length를 과발현시켰을 때 *E. coli*는 성장의 저해를 받아 거의 성장하지 못하였다 (data not shown). 즉 발현 vector 내에서 강력한 promoter 하류에 연결된 *pqrA* 유전자가 basal expression에 의해 발현되는 양 정도만 *E. coli* 내에서 합성되어도 세포의 성장에 장애를 일으킴을 암시한다. 한편 형질전환 식물에서의 *pqrA* transcript와 PqrA 단백질의 축적량 사이에는 정의 상관관계를 가졌는데 RNA 발현이 높을수록 단백질 발현량도 높게 나타났다. 따라서, 식물에 도입된 *pqrA* 유전자의 발현이 paraquat 내성에 미

치는 영향을 조사하기 위하여 발현량이 서로 다른 세 line을 이용하여 paraquat 및 다른 약제에 대한 내성을 조사하였다.

마. 형질전환 식물체의 내성 확인

1) 형질전환 식물체의 paraquat에 대한 내성 확인

Paraquat 내성유전자 *pqrA*가 도입된 형질전환 식물체가 paraquat에 대해서 내성을 가지는지 여부를 확인하기 위하여 형질전환 식물체에 직접 paraquat을 처리하였다. PqrA 단백질의 항상적 발현에 따른 내성의 차이를 확인하기 위하여 immunoblot 분석에서 PqrA 단백질의 축적량이 비교적 적었던 형질전환식물 1, 중간정도의 4, 가장 많았던 7을 이용하여 paraquat에 대한 내성 정도를 조사하였다. Paraquat 처리조건에 따른 변이를 줄이기 위하여 wild-type 및 형질전환 식물체의 T₂ 종자를 멸균하여 MS 배지에 파종하여 2주간 생육시킨 유식물을 처리에 사용하였다.

Paraquat은 세포 내에서의 작용부위가 주로 엽록체이므로 paraquat 처리 후 4일째의 잎으로부터 chlorophyll 함량을 조사하였다 (그림 2-33B). 그 결과, paraquat을 처리하기 전의 chlorophyll 함량은 wild-type과 형질전환 식물체 모두 0.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ leaf 정도로 비슷하였다. 반면, paraquat 처리 후 4일째의 chlorophyll 함량은 wild-type의 경우 0.27 $\mu\text{g}/\text{mg}$ leaf으로 현저히 감소하였으나, 형질전환 식물체 1과 4의 경우 각각 0.44와 0.48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ leaf, PqrA 단백질의 축적량이 가장 많았던 형질전환 식물 7의 경우는 0.72 $\mu\text{g}/\text{mg}$ leaf으로 chlorophyll 함량이 높게 나타났다. 즉, wild-type의 경우 paraquat 처리에 의해 chlorophyll 함량이 69.2%나 감소하였으나, 형질전환 식물체 1, 4 및 7은 각각 45%, 38% 및 14.7% 만이 감소되어 PqrA 단백질의 항상적 발현에 의해서 엽록체가 paraquat에 의한 손상으로부터 내성을 나타냄을 확인하였다.

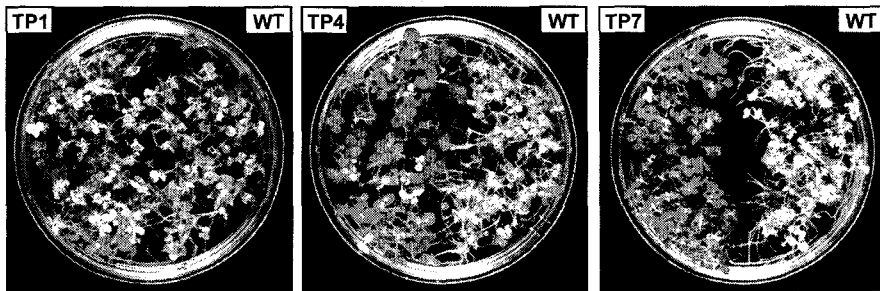
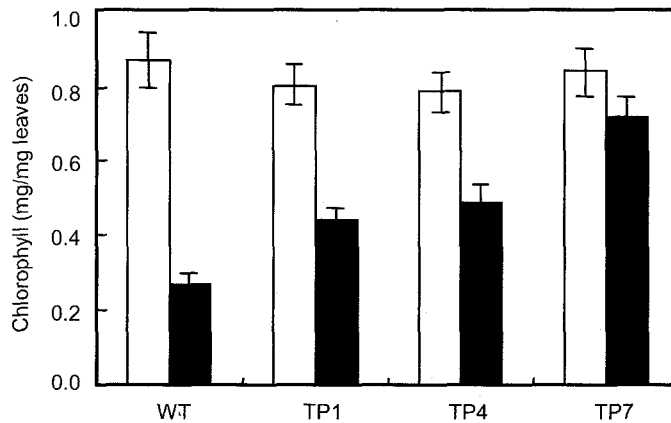
A**B**

Fig. 2-33. Expression of *pqrA* gene in plant increases resistance to paraquat.

A, Three transgenic lines that expressed different levels of PqrA protein were grown for 2 weeks and subjected to paraquat treatment. Numbers indicate independent transgenic lines (TP1, low level; TP4, moderate level; TP7, high level of expression of PqrA). B, Total chlorophyll contents in leaves from wild-type (WT) and transgenic plants (TP) before (open bars) and 4 days after (solid bars) paraquat treatment.

또한, paraquat 처리 후의 chlorophyll 함량 감소율이 PqrA 단백질의 축적량과 비례하여 현저히 감소되는 것으로 나타나 *pqrA* 유전자의 발현량과 내성의 획득정도 사이에 정의 상관관계가 관찰되었다.

형질전환 식물체의 내성의 획득여부를 chlorophyll 함량과 더불어 paraquat 처리 후의 wild-type과 형질전환 식물체의 생존률로 조사하였다. 그림 2-33A는 5 μ M의 paraquat을 처리한 후 4일간 성장시켰을 때의 생존 정도를 나타낸 것이다. 그 결과, wild-type의 경우 대부분의 식물체가 완전히 고사하였으나 형질전환 식물체들은 정상적으로 성장하였다. 한편 형질전환 식물체들의 생존 정도의 비교에서 PqrA 단백질의 축적량이 가장 많았던 7의 경우 90%이상의 높은 생존률을 나타내었다. 이 결과는 그림 2-33B에 나타난 paraquat 처리 4일 후의 chlorophyll 함량의 변화에 대한 비교에서 형질전환 식물체 7의 경우 wild-type에 비해 4.7배의 높은 chlorophyll 함량이 유지되었던 결과와 일치한다. 따라서, PqrA 단백질의 축적이 형질전환 식물체의 paraquat에 의한 광합성 기관의 손상으로부터 보호함으로써 정상적인 광합성 반응을 유지시키고, 결과적으로 paraquat에 대한 내성을 증가시킨 것으로 생각된다.

3 line의 형질전환 식물체 중 paraquat에 대한 내성이 가장 높게 나타난 TP7의 paraquat 처리 농도에 따른 성장정도를 조사해 보았다. 파종 후 2주된 유식물에 0~20 μ M의 paraquat을 처리한 후 배양 4일째에 그 변화를 관찰하였다 (그림 2-34). 그 결과, 대조구인 wild-type 식물체는 1 μ M의 paraquat 처리에서부터 잎에 갈변현상이 나타나기 시작하였으며, 5 μ M 이상의 처리농도에서는 완전히 고사하였다. 그러나 형질전환 식물체 TP7은 5 μ M까지는 paraquat 처리에 의한 생육저해가 paraquat 비처리구와 차이를 나타내지 않았으며, 10 μ M에서부터 약간의 저해 현상이 나타나기 시작하였다. 고농도인 20 μ M 처리에서는 wild-type에 비해 고사되는 속도는 지연되었으나 최종적으로는 모두 고사하였다. 식물체의 paraquat에 의한 저해 현상은 식물체의 일령, 광 조건 등에 따라 다른데 본 연구에서는 이러한 요인들을 최소화하고 그 결과의 판별이 가장 확실한 시기에 그 변화를 관찰하기 위하여 유식물 단계에서 paraquat을 처리하고 paraquat 처리 후 4일째에 관찰하였다.

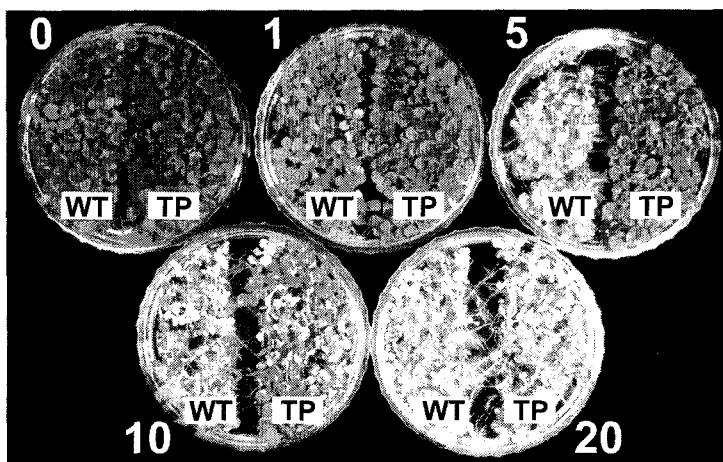


Fig. 2-34. Effect of paraquat concentration on the growth of wild-type (WT) and transgenic (TP) plants.

Plantlets grown for 2 weeks on MS medium were subjected to paraquat treatment, then they were incubated at normal growth conditions. Photographs were taken 4 days after paraquat treatment. Numbers indicate concentrations of paraquat (μM).

Paraquat 처리 후 계속 배양하였을 때 형질전환 식물체는 정상적으로 성장하여 개화 및 결실되었으나, 대조구인 wild-type은 paraquat 처리에 의한 저해 작용으로 더 이상 성장하지 못하고 완전히 고사되었다. 이러한 결과들로 미루어 보았을 때 *pqrA* 유전자가 도입된 형질전환 식물체의 경우, paraquat 처리후의 chlorophyll 함량의 변화를 기초로 하여 비교하였을 때 약 5배의 paraquat에 대한 내성 증가를 나타내었으며 (그림 2-33B), 유식물 단계에서 5 μ M의 paraquat 처리에 의한 생존율을 기초로 했을 때는 9배 이상의 내성의 증가가 관찰되었다 (그림 2-34).

2) 형질전환 식물체의 과산화 화합물에 대한 내성 확인

Paraquat에 대해 내성을 가진 형질전환 식물체가 다른 과산화 화합물에 대해서도 내성을 가지는지를 알아보기 위하여 5 μ M의 paraquat, 5 μ M의 diquat, 1 mM의 menadione 및 10 μ M의 plumbagin을 각각 처리하여 그 변화를 1주일 후에 관찰하였다 (그림 2-35). 그 결과, paraquat과 diquat에 대해서는 거의 동일한 수준의 내성 획득을 나타내었으나, menadione과 plumbagin에 대해서는 wild-type과 비교할 때 내성의 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 *E. coli*에서의 결과 (그림 2-14)와 일치하는 것으로 식물체에 도입된 *pqrA*가 *E. coli*에서와 같은 기능으로 paraquat에 대해 특이적으로 내성을 가진다는 것을 나타내는 것으로 판단된다.

3) 비광합성 기관인 뿌리에서의 내성 확인

형질전환 식물체 내에서 *pqrA* 유전자의 조직 특이적인 발현을 조사하기 위하여 잎, 줄기 및 뿌리를 이용하여 northern blot 분석과 immunoblot 분석을 실시하였다 (그림 2-36). Northern blot 분석을 위하여 각 조직으로부터 total RNA를 분리하였으며, probe로는 *pqrA* 유전자를 포함하는 0.9 kb 크기의 *SalI* 단편을 사용하였다.

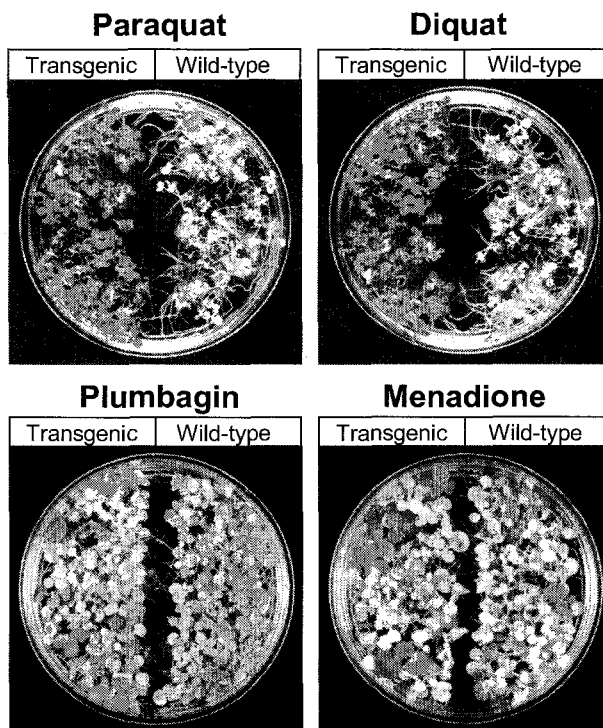


Fig. 2-35. Effect of superoxide generators on the growth of wild-type and transgenic plants.

Plants were grown on MS medium for 2 weeks and then treated with paraquat (5 μ M), diquat (5 μ M), menadione (1 mM), or plumbagin (10 μ M).

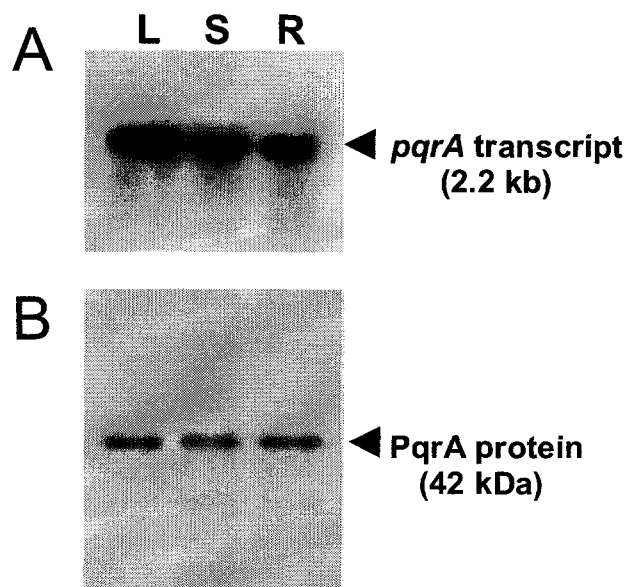


Fig. 2-36. Tissue specific expression of *pqrA* gene in transgenic plants.

A, Northern blot. Total RNA (20 μg) was extracted from leaves (L), stems (S) and roots (R), and separated by electrophoresis and probed with the *pqrA*-specific probe. B, Immunoblot analysis. Membrane protein (30 μg) fractions were prepared from various tissues and subjected to immunoblot analysis.

그 결과, 도입된 *pqrA*가 모든 조직에서 항상적으로 발현되고 있음이 확인되었으며, 각 조직에 따른 발현량의 차이는 보이지 않았다 (그림 2-36A). Immunoblot 분석은 각 조직으로부터 membrane fraction을 분리한 후 PqrA 항체를 이용하여 분석하였다. 그 결과, northern blot 분석에서와 동일하게 모든 조직에서 PqrA 단백질이 확인되었으며, 발현량의 차이 또한 나타나지 않았다 (그림 2-36B). 즉, 식물에 도입된 *pqrA* 유전자는 조직 특이적으로 발현하는 것이 아니라 모든 조직에서 항상적으로 발현하고 있음을 확인하였다. 따라서, 형질전환 식물체의 잎에서 확인되었던 paraquat에 대한 내성이 비광합성 기관인 뿌리의 성장에도 영향을 미치는지를 확인해 보았다.

Paraquat의 종자발아 단계에서 뿌리의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 종자를 5 μ M의 paraquat이 첨가된 MS 배지에 파종한 후 발아 될 때까지 암상태에서 배양하고 발아 후 동일한 광조건에서 배양하였다. 파종 6주 후 발아율을 측정하고 뿌리의 발육정도를 Pellet (1996)의 방법으로 계산하여 paraquat에 의한 뿌리의 발육 저해율을 계산하였다 (그림 2-37B). 5 μ M의 paraquat에서 wild-type과 형질전환 식물체 간의 종자 발아율의 차이는 보이지 않았으나, 일단 발아되고 자엽이 전개되기 시작하는 1주일 이후에는 생장의 차이를 보였는데 wild-type에서는 shoot의 굵기가 가늘어지고 길이 신장을 하지 못하였다. 또한, paraquat을 엽면에 직접 처리했을 때 처리 후 2일째부터 나타났던 잎의 고사 현상은 엽면 처리때 보다 반응이 늦게 나타나서 파종 2주 후부터 잎의 고사현상이 나타나기 시작하였다. 그러나 형질전환 식물체는 paraquat 무처리구와 비교했을 때 약간의 뿌리 발육의 저해가 있었으나 잎이 잘 전개되고 뿌리도 정상적으로 성장하였다. 파종 6주 후 뿌리 길이를 비교해 본 결과 wild-type은 paraquat에 의한 저해 작용으로 뿌리 길이도 짧았으며 성장저해로 인해 엽면적 또한 작았고 줄기의 신장도 저해 되었다 (그림 2-37A). 그러나 형질전환 식물체는 paraquat 무처리에 비해 다소의 저해작용이 보이기는 하였으나 잎이 정상적으로 전개되었고 줄기의 신장 및 뿌리의 발육이 무처리구와 거의 동일하였다. Paraquat에 의한 뿌리의 저해 정도를 계산한 결과, wild-type은 뿌리의 저해 정도가 63%였으나

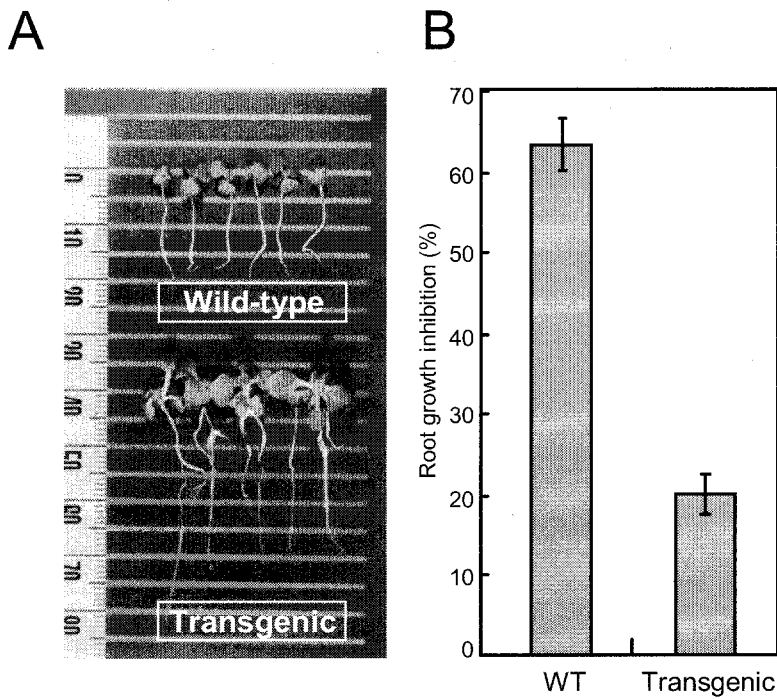


Fig. 2-37. Root growth of wild-type and transgenic plants on the medium containing paraquat.

A, Wild-type and transgenic plants were germinated and grown for 6 weeks on MS medium containing 5 μ M paraquat. B, Root growth inhibition of wild-type and transgenic plants by paraquat treatment.

% root growth inhibition = $[1 - \{\text{root length in paraquat} / \text{root length without paraquat}\}] \times 100$.

형질전환체는 20%로 나타나 도입된 *pqrA* 유전자에 의해 저해정도가 약 1/3정도 감소 되는 것으로 나타났다. 따라서 형질전환 식물체에서 발현되는 PqrA 단백질은 paraquat에 대한 감수성이 가장 큰 광합성 기관인 잎조직 뿐만 아니라 비광합성 기관인 뿌리에도 내성을 부여함을 확인하였다.

2. 목초 재분화계의 확립

Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 목초인 오차드그래스와 연간 우리나라 목초 종자 수입량의 약 66%를 차지하는 이탈리아 라이그래스를 선택하여 캘러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립하고자 하였다. 본 연구에 사용한 목초의 종자는 농촌진흥청 축산기술연구소에서 표준재배법으로 재배되어 채종한 종자를 분양받아 공시품종으로 사용하였다.

1) 오차드그래스

가. 재료식물 및 배양조건

오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.)의 품종 중 Potomac, Amba, Glorus, Key 및 Udder의 종자를 외영과 내영을 제거한 다음, 70% ethanol에 30초간 표면살균하고 1% NaOCl 용액에 50분간 소독한 후, 멸균수로 3회 세정하였다. 종자를 3 mg/l의 2,4-D, 30 g/l의 sucrose, 6 g/l의 gelrite가 첨가된 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 배지에서 42일 동안 암상태로 배양하여 캘러스를 유기시켰으며, 이들 캘러스를 직경 2~3 mm 크기로 세분하여 1 mg/l의 NAA, 5 mg/l의 kinetin, 30 g/l의 sucrose, 6 g/l의 gelrite가 첨가된 MS 배지에 이식하여 26±1℃, 16시간 광상태에서 식물체를 재분화시켰다. 캘러스 형성능력은 1 종자당 형성된 캘러스 생체중을 7반복으로 조사하였으

며, 식물체 재분화는 이식된 캘러스에 대한 식물체가 형성된 캘러스의 비율로 나타내었다.

오차드그래스의 종자배양에 알맞은 적정배지를 구명하기 위하여 N₆ (Chu 1978), B₅ (Gamborg et al, 1968) 및 MS 배지를 사용하여 캘러스 형성률과 식물체 재분화능력을 각 배지간에 비교하였다. 또한, 오차드그래스의 종자 배양시 배지 내에 첨가되는 성장조절제의 적정농도를 구명하기 위하여 2,4-D의 농도를 0, 1, 3, 5, 7 mg/l로 각각 조절하여 암상태로 배양한 다음, 이들 캘러스를 재분화배지에 이식하여 식물체 획득효율을 비교하였다.

나. 품종간 차이 조사

오차드그래스의 성숙종자 배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화의 품종간 차이를 조사한 결과 (표 2-7), 공시품종 중 Glorus의 경우 1 종자당 형성된 캘러스 생체중과 식물체 재분화율이 115 mg과 9%로 가장 낮게 나타났으며, Potomac의 경우 캘러스 생

Table 2-7. Varietal differences of callus growth and plant regeneration in the mature seed culture of orchardgrass

Cultivars	Fresh weight of callus/seed Mean ± SD (mg)	No. of calli transferred	No. of calli with	
			root (%)	plant (%)
Potomac	208 ± 8.9	100	32 (32.0)	28 (28.0)
Amba	185 ± 9.2	100	30 (30.0)	26 (26.0)
Glorus	115 ± 7.8	100	21 (21.0)	9 (9.0)
Key	141 ± 8.5	100	24 (24.0)	13 (13.0)
Udder	168 ± 8.0	100	28 (28.0)	15 (15.0)

체중도 208 mg으로 가장 높았고, 식물체 재분화율도 28%로 가장 높게 조사되었다. 또한 켈러스 생체중이 무거운 품종이 식물체 재분화 능력도 높은 것으로 나타났다. 일반적으로 식물 조직배양은 배지조건, 배양환경, 모식물의 genotype 등에 따라 배양효율이 다르며, 이러한 요인들 중에서 모식물의 genotype이 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 종자에서 형성된 켈러스로부터의 식물체 재분화율이 품종에 따라 9~28%의 넓은 변이폭을 나타내었다.

다. 배양조건의 구명

오차드그래스의 종자배양에서 켈러스 형성과 식물체 재분화에 적합한 배지를 선정하고자, 켈러스 형성 및 식물체 재분화율이 가장 높게 조사된 Potomac을 사용하여 N₆, B₅ 및 MS 배지에 배양하였다 (표 2-7). 그 결과, 켈러스 생체중은 MS 배지에서 208 mg, N₆ 배지에서 189 mg 그리고 B₅ 배지에서 122 mg으로 각각 나타났다. 또한 식물체 재분화율은 MS 배지에서 28%, N₆ 배지에서 21% 그리고 B₅ 배지에서 11%를 각각 나타내었다. 따라서, 오차드그래스의 종자배양에서 효율적인 켈러스 형성과 식물체 재분화를 위해서는 MS 배지에서 배양하는 것이 가장 효과적일 것으로 판단되었다.

오차드그래스의 종자배양에 적합한 식물 성장조절제의 종류와 적정농도를 구명하기 위하여 멸균된 종자를 0~7 mg/l의 2,4-D가 첨가된 배지에 배양한 결과 (표 2-8), 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서는 거의 켈러스가 형성되지 않았으나 성장조절제가 첨가된 배지에서는 켈러스가 유도되었다. 이때 켈러스 생체중은 1 mg/l의 농도에서는 176 mg, 3 mg/l의 농도에서는 208 mg, 5 mg/l의 농도에서는 236 mg 그리고 7 mg/l의 농도에서는 207 mg을 나타내어 2,4-D의 농도가 증가할수록 켈러스 생체중이 무거운 경향을 나타내었으나, 7 mg/l 이상의 농도에서는 오히려 켈러스 생체중이 감소하는 것으로 조사되었다.

Table 2-7. Effect of basic medium on callus growth and plant regeneration in mature seed culture of orchardgrass

Media	Fresh weight of callus/seed ^{a)} Mean ± SD (mg)	No. of calli transferred	No. of calli with	
			root (%)	plant (%)
MS	208 ± 8.9	100	32 (32.0)	28 (28.0)
N ₆	189 ± 8.9	100	25 (25.0)	21 (21.0)
B ₅	122 ± 9.1	100	16 (16.0)	11 (11.0)

^{a)} Cultivar : Potomac

Table 2-8. Effect of 2,4-D concentration on callus growth and plant regeneration in mature seed culture of orchardgrass

2,4-D (mg/ℓ)	Fresh weight of callus/seed ^{a)} Mean ± SD (mg)	No. of calli transferred	No. of calli with	
			root (%)	plant (%)
0	-	-	-	-
1	176 ± 8.9	100	20 (20.0)	21 (21.0)
3	208 ± 8.9	100	32 (32.0)	28 (28.0)
5	236 ± 7.8	100	36 (36.0)	11 (11.0)
7	207 ± 9.6	100	41 (41.0)	9 (9.0)

^{a)} Cultivar : Potomac

이식된 캘러스로부터 뿌리가 형성된 캘러스의 비율은 2,4-D의 농도가 높을수록 증가하였으나, 식물체 재분화율은 3 mg/l의 2,4-D가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스가 28%로 가장 높게 조사되었다.

그림 2-38은 오차드그래스 종자유래의 다양한 캘러스 형태와 형성된 캘러스로부터 식물체가 재분화되는 양상을 나타내고 있다. 오차드그래스의 종자배양에서 배양 20일 경부터 표면이 황갈색이면서 조직이 치밀하지 않은 캘러스 (그림 2-38A-a)와 담갈색이면서 표면이 점액성인 캘러스 (그림 2-38A-b) 및 표면이 희고 조직이 치밀하며 friable한 캘러스 (그림 2-38A-c)가 발생되었다. 유도된 캘러스를 재분화 배지에 이식한 후 배양 5일 후부터 shoot (그림 2-38B and C)이 형성되기 시작하였으며, 형성된 shoot을 발근배지로 옮겨 완전한 식물체로 분화시켰다 (그림 2-38D). 기내에서 지상부와 지하부가 완전히 전개된 식물체를 화분으로 옮겨 생장실에서 생육시켰다 (그림 2-38E).

2) 이탈리아 라이그래스 (*Lolium multiflorum* Lam.)

가. 재료식물 및 배양조건

이탈리아 라이그래스의 종자배양에서 캘러스 형성 및 식물체 재분화를 위한 적정 배지를 선정하기 위하여, Jeanne를 공시품종으로 하여 2 mg/l의 2,4-D, 30 g/l의 maltose, 2 g/l의 casein hydrolysate, 5 g/l의 gelrite가 첨가된 MS (Murashige와 Skoog, 1962), N₆ (Chu 등, 1975) 및 B₅ (Gamborg 등, 1968) 배지에 각각 종자를 치상한 다음, 26±1℃에서 암상태로 배양하였다. 배양 14일 후에 발아된 종자로부터 shoot와 root를 제거하고, 유기된 callus 만을 떼어 새 배지로 계대하여 다시 28일간 배양하였다. 캘러스는 1 mg/l의 NAA, 5 mg/l의 kinetin, 30 g/l의 maltose, 5 g/l의 gelrite가 첨가된 MS 배지에 이식하여 배양 45일 후의 식물체 재분화율을 조사하였다.

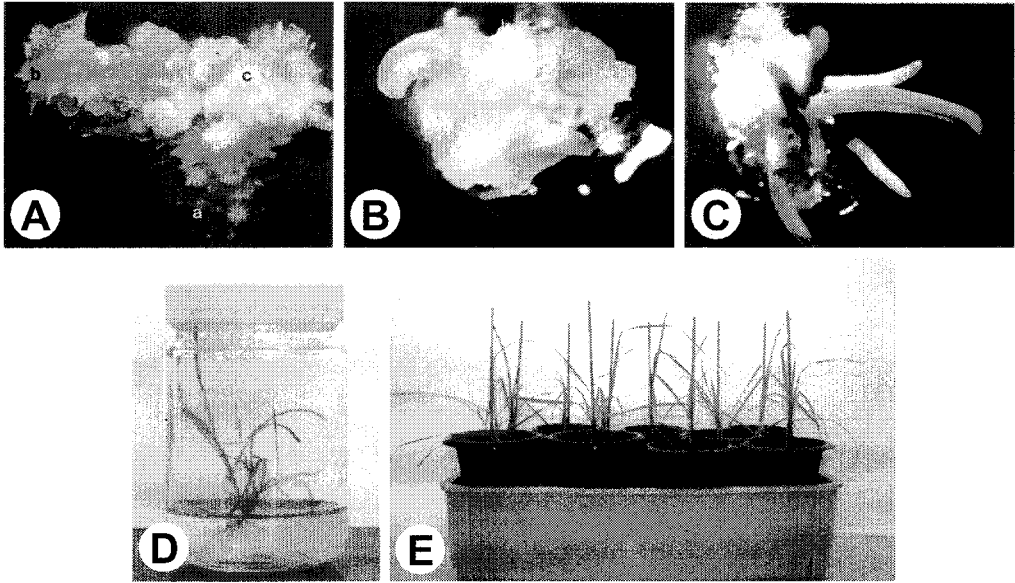


Fig. 2-38. Plant regeneration from seed derived callus in orchardgrass.

A, Callus formation from mature seed of orchardgrass. a) Soft callus with a pale-gray colour. b) Watery gelatinous callus. c) Compact and friable callus. B, Development of plantlet at 5 days after culture. C, Plant regeneration 14 days after culture. D, Regenerated plantlets with roots and shoots. E, Regenerated plants cultivated in pots for 5 weeks.

그리고 배지 내에 첨가되는 적정 탄소원을 구명하기 위하여 기본배지로 MS 배지를 사용하여, 캘러스 유도 및 식물체 재분화 배지에 maltose와 sucrose를 각각 첨가하여 탄소원의 종류에 따른 캘러스 형성 및 식물체 재분화 능력을 비교하였다.

이탈리안 라이그래스의 종자배양에서 식물체 재분화 능력의 품종간 차이를 조사하기 위하여, Jeanne 외 3품종 (Surrey, Tachi-wase 및 Rio)을 이용하여 2 mg/l의 2,4-D, 30 g/l의 sucrose, 2 g/l의 casein hydrolysate, 5 g/l의 gelrite가 첨가된 MS 배지에 종자를 치상하여 캘러스를 유기시킨 다음, 캘러스를 1 mg/l의 NAA, 5 mg/l의 kinetin이 첨가된 MS 배지에 이식하여 식물체 재분화 능력을 비교하였다.

캘러스 생체중은 배양 6주 후에 1립의 종자에서 유기된 캘러스의 무게로 조사하였으며, 식물체 재분화는 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 광상태에서 45일간 배양한 다음 이식된 캘러스에 대한 식물체가 유기된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다.

나. 최적 배지의 구명

이탈리안 라이그래스의 성숙종자 배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화의 품종간 차이를 조사하기 위하여 이탈리안 라이그래스의 품종 중 Jeanne의 종자를 2 mg/l의 2,4-D가 첨가된 MS, N₆ 및 B₅ 배지에 배양하여 캘러스 형성 정도와 식물체 재분화율을 비교한 결과, B₅ 배지에서 형성된 캘러스의 생체중은 11.9 mg인 반면에 MS 배지에서 형성된 캘러스는 17.9 mg을, 그리고 N₆ 배지에서 형성된 캘러스의 생체중은 14.1 mg을 각각 나타내었다. 또한, 이들 캘러스를 1 mg/l의 NAA와 5 mg/l의 kinetin을 첨가한 각각의 재분화 배지에 이식하였을 때, B₅ 배지와 N₆ 배지에서 형성된 캘러스로부터의 재분화율은 11%와 22%를 각각 나타내었으나, MS 배지에서 형성된 캘러스는 31%의 높은 재분화 능력을 나타내었다 (표 2-9).

일반적으로 화분과 작물의 조직배양에서는 N₆ 배지가 MS 배지보다 효율적이라고 알려져 있는데 (Vasil과 Vasil, 1984), 사료작물인 켄터키 블루그래스의 종자배양

(Griffin과 Dibble, 1995; Van der Valk 등, 1995)과 톨 페스큐의 미숙배 (Bai와 Qu, 2001) 및 화서 배양 (Eizanga와 Dahleen, 1990)에서 식물체 재분화에는 MS 배지를 주로 이용하고 있는 실정이다. 본 연구에서도 이탈리아 라이그래스의 종자배양에 있어서 MS 배지가 N₆ 및 B₅ 배지보다 캘러스 형성 및 식물체 재분화 효율이 높게 나타남을 확인하였다.

Table 2-9. Effect of basic medium on callus growth and plant regeneration in seed culture of Italian ryegrass

Basic media	No. of seeds transferred	Callus weight of per seed ^{a)} (mg)	No. of calli transferred	% of plant regeneration
N ₆	100	14.1±3.7	100	22.0
MS	100	17.9±4.9	100	31.0
B ₅	100	11.9±2.1	100	11.0

^{a)}Cultivar : Jeanne

Table 2-10. Effect of carbon sources on callus growth and plant regeneration in seed culture of Italian ryegrass

Carbon sources	No. of seeds transferred	Callus weight of per seed ^{a)} (mg)	No. of calli transferred	% of plant regeneration
Maltose	100	17.9±4.9	100	31.0
Sucrose	100	20.5±3.7	100	51.0

^{a)}Cultivar : Jeanne

다. 배지 내 탄소원의 구명

이탈리안 라이그래스의 종자배양에서 배지 내에 첨가되는 탄소원의 종류가 캘러스 형성 및 식물체 재분화율에 미치는 영향을 품종 중 Jeanne를 사용하여 조사하였다 (표 2-10). 그 결과, maltose 첨가구의 경우 캘러스 생체중과 식물체 재분화율은 17.9 mg과 31%를 나타낸 반면에 sucrose 첨가구의 경우 20.5 mg과 51%를 나타내어 sucrose가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스가 생체중도 무겁고 식물체 재분화율도 높은 양상을 나타내었다. 식물 조직배양에 있어서 배지 내에 첨가되는 탄소원은 일반적으로 sucrose가 주로 이용되고 있는데, 작물에 따라서 glucose나 maltose를 첨가하여 배양효율을 향상시킨 예가 밀, 감자에서 보고된 바 있다 (Vasil과 Vasil, 1984). 본 연구에서는 maltose보다는 sucrose를 배지 내에 첨가하면 배양효율이 크게 향상되는 것으로 나타났는데, 탄소원의 보다 구체적인 효과를 구명하기 위해서는 여러 가지 탄소원의 단용 또는 혼용의 효과에 대한 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

라. 품종간 차이 조사

이탈리안 라이그래스의 종자배양에서 30 g/l의 sucrose가 첨가된 MS 배지가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 효과적인 것으로 나타났다. 따라서, 이러한 배지 조성이 다른 품종의 식물체 재분화 능력에 어떠한 차이를 나타내는지 여부를 조사하기 위하여 'Jeanne' 외 3 품종의 식물체 재분화 능력을 비교한 결과 (그림 2-39), 식물체 재분화 능력은 품종에 따라 17~51%까지의 큰 차이를 나타내었는데, 특히 Jeanne는 51%의 높은 식물체 재분화 능력을 나타내었다. 그러나 Rio, Tachi-wase 및 Surrey는 각각 32%, 21% 및 17%의 식물체 재분화 능력을 나타내어 모식물의 genotype에 따라서 큰 차이를 나타내는 것으로 조사되었다.

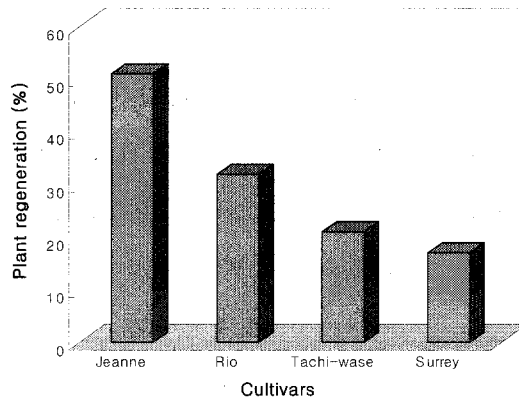


Fig. 2-39. Varietal difference of plant regeneration ability from seed-derived calli of Italian ryegrass.

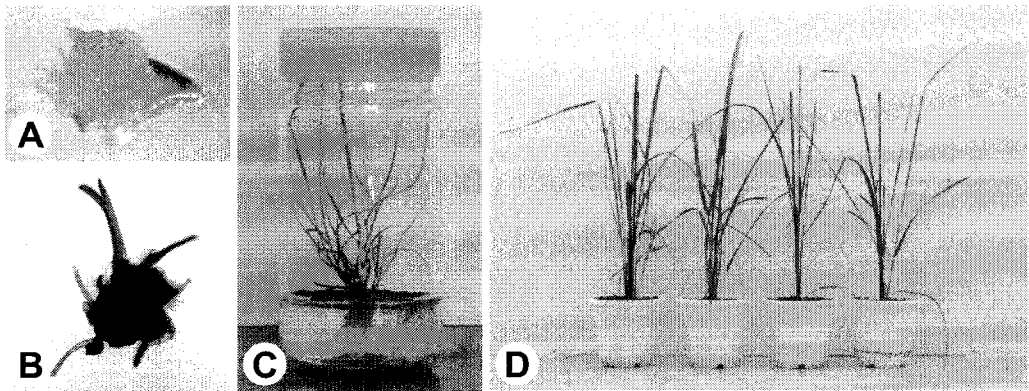


Fig. 2-40. Plant regeneration from seed-derived calli in seed culture of Italian ryegrass.

A, Callus formation from seed cultured on medium. B and C, Plantlet development from seed-derived calli. D, Regenerated plants cultivated in pots for 5 weeks.

그림 2-40은 이탈리아 라이그래스의 종자배양 과정을 나타내는 것으로 2 mg/l의 2,4-D가 첨가된 배지에 종자를 배양하면 배양 15~20일경부터 배반부분에서 캘러스가 형성되며 (그림 2-40A), 형성된 캘러스를 재분화 배지에 이식하면 배양 10일 후부터 식물체가 재분화되기 시작하였다 (그림 2-40B). 그리고 재분화된 어린 식물체를 생장 조절제가 첨가되지 않은 MS 배지로 이식하였을 때 정상 식물체 (그림 2-40C)로 발육되었으며, 이들 식물체를 순화처리 후 pot로 옮겨 재배하였다 (그림 2-40D).

이탈리아 라이그래스의 조직배양에 관한 이상의 결과로 보아 이탈리아 라이그래스의 종자배양에서는 2 mg/l의 2,4-D와 30 g/l의 sucrose가 첨가된 MS 배지에서 배양하여 캘러스를 유기시킨 다음, 1 mg/l의 NAA와 5 mg/l의 kinetin이 첨가된 MS 배지에 캘러스를 이식하면 식물체 재분화에 적합한 것으로 나타났다. 또한 이탈리아 라이그래스의 품종 중 Jeanne는 51%의 높은 식물체 재분화 능력을 나타내어 이 품종에서 형성된 캘러스는 유용 유전자의 형질전환을 위한 식물재료로 적합할 것으로 판단되었다.

3. Paraquat 내성목초의 개발

Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 토양으로부터 paraquat 내성균인 *O. anthropi* JW-2를 선발한 다음, paraquat 내성유전자인 *pqrA*를 분리하였다 (제2장 3절). *pqrA* 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector인 pGA748의 CaMV 35S promoter 하류에 도입하여 모델식물인 담배에 형질전환한 다음, paraquat에 대한 내성의 획득을 확인하였다 (제2장 4절-1). 따라서, *pqrA* 유전자를 목초에 도입하여 paraquat 내성목초를 개발하기 위하여 화본과 목초인 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스의 식물체 재분화 계를 확립하였고 (제2장 4절-2), 이에 근거하여 형질전환 목초를 구축하여 paraquat에 대한 내성의 획득여부를 확인하였다.

또한 형질전환 목초 내에서 *pqrA* 유전자의 발현량 증가가 paraquat 내성 획득에 미치는 영향을 조사하기 위하여 CaMV 35S promoter의 enhancer sequence를 클로닝하여 35S promoter의 상위에 multimerization (4 반복)한 다음, 오차드그래스 및 이탈리아 라이그래스에 형질전환하여 내성의 획득정도를 비교하였다.

가. 발현 vector의 구축

1) pIG-pqr2.1

화분과 목초인 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스의 형질전환을 위해서는 선발 표지로서 hygromycin 내성유전자를 가지고 있는 binary vector pIG121-Hm을 이용하였다. pBpq2.5 DNA를 제한효소 *Hind*III로 절단하여 paraquat 내성유전자인 *pqrA*를 포함하는 2.1 kb의 DNA 단편을 회수한 다음, pET28a vector에 도입하여 pET-pqr2.1을 구축하였다. pET-pqr2.1을 다시 제한효소 *Not*I과 *Sac*I으로 절단하여 DNA 단편을 회수한 다음, *Not*I과 *Sac*I으로 절단한 pBluescriptII KS+ vector에 도입하여 pBpq2.1을 구축하였다. pBpq2.1을 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하여 *pqrA*를 포함하는 2.1 kb의 단편을 회수하여 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하여 *GUS* 유전자를 제거한 pIG121-Hm의 CaMV 35S promoter의 하류에 도입하여 최종적으로 발현 vector pIG-pqr2.1을 구축하였다 (그림 2-41A). 구축된 pIG-pqr2.1 plasmid DNA를 분리하여 제한효소 분해 후, agarose gel 전기영동하여 *pqrA* 유전자의 도입을 확인하였다 (그림 2-41B).

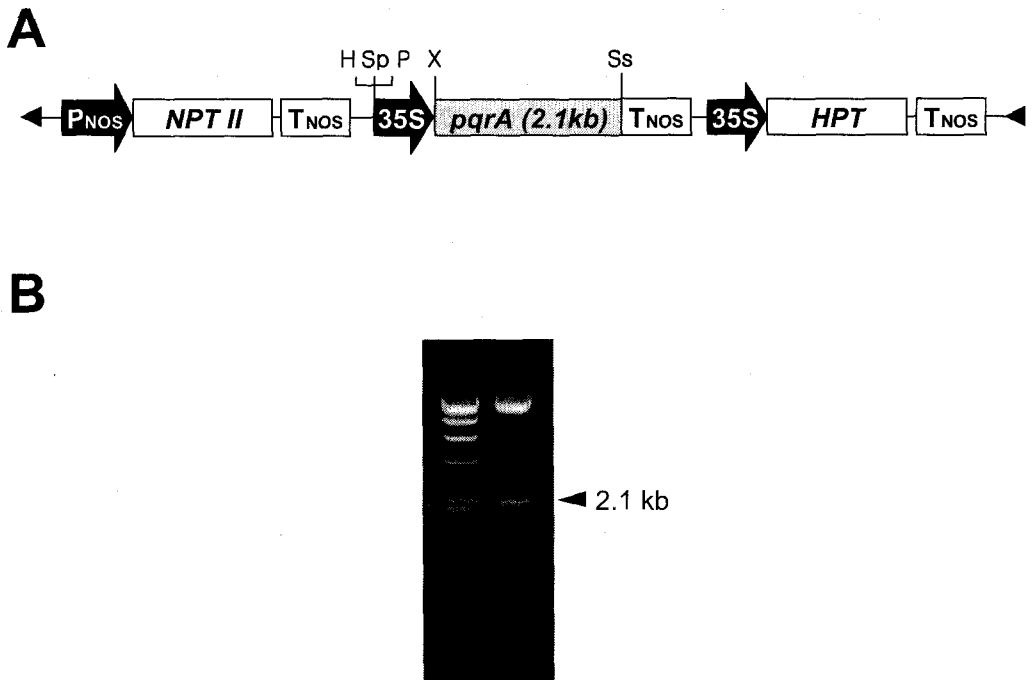


Fig. 2-41. Construction of the expression vector, pIG-pqr2.1.

A, Structure of pIG-pqr2.1. The 2.1 kb DNA fragment containing *pqrA* gene was placed under the control of the CaMV 35S promoter. H, *Hind*III; Sp, *Sph*I; P, *Pst*I; X, *Xba*I; Ss, *Sac*I. B. Identification of pIG-pqr2.1. pIG-pqr2.1 DNA was digested with *Xba*I and *Sac*I.

2) pIG-Epqr1.3

(가) CaMV 35S promoter enhancer의 탐색

식물체 형질전환을 위한 발현 vector에 사용되고 있는 CaMV 35S promoter의 enhancer 영역에 대한 자료를 조사한 결과, CaMV 35S promoter의 -343 ~ -46 sequence가 기능부위로 보고되었다 (Fang 등, 1989). 또한 -209 ~ -46 sequence가 multimer 특히 tetramer (4반복)로 존재할 때 형질전환 식물체 내에서 35S promoter의 하류에 도입된 유전자의 발현량이 가장 높은 것으로 보고되었다 (Fang 등, 1989). 따라서, 형질전환 목초에 도입된 paraquat 내성유전자 *pqrA*의 발현량 증가를 위하여 CaMV 35S promoter의 enhancer sequence (-209 ~ -46; 163 bp; 그림 2-42A)를 PCR을 이용하여 증폭하였다. 이때 5'-sense primer 내에는 *Xba*I site를 그리고 3'-antisense primer 내에는 *Spe*I site를 각각 도입하였다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *Xba*I과 *Spe*I으로 절단한 다음, *Xba*I과 *Spe*I으로 절단한 pBluescriptII SK+ vector에 클로닝하여, pBEI을 구축하였다 (그림 2-42B).

(나) Enhancer의 multimerization

35S enhancer sequence의 multimerization을 위하여 pBEI을 제한효소 *Not*I과 *Spe*I으로 절단하여 163 bp의 enhancer DNA 단편을 회수한 다음, 제한효소 *Not*I과 *Xba*I으로 절단한 pBEI에 도입하여 enhancer가 2개 연속 도입된 pBEII를 구축하였다. pBEII를 다시 제한효소 *Not*I과 *Spe*I으로 절단하여 326 bp의 2×enhancer DNA 단편을 회수한 다음, 제한효소 *Not*I과 *Xba*I으로 절단한 pBEI에 도입하여 enhancer가 3개 연속 도입된 pBEIII를 구축하였다. 이러한 과정을 한번 더 반복하여 enhancer sequence가 4반복으로 도입된 pBEIV를 구축하였다 (그림 2-43).

A

```

-299 gaattaattc ccgatcctat ctgtcacttc atcaaaaagga cagtagaaaa ggaaggtggc
                                     XbaI
-239 actacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca
-179 gtggtcctcaa agatggacc caccacaga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa
-119 ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac
                                     SpeI
-59  aatcccacta tccttcgcaa gacccttct ctatataagg aagttcattt catttggaga
-1   ggacacgctg aaatcaccag tctctctcta ca

```

B

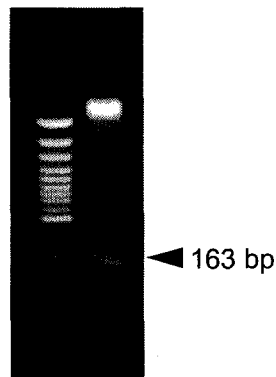
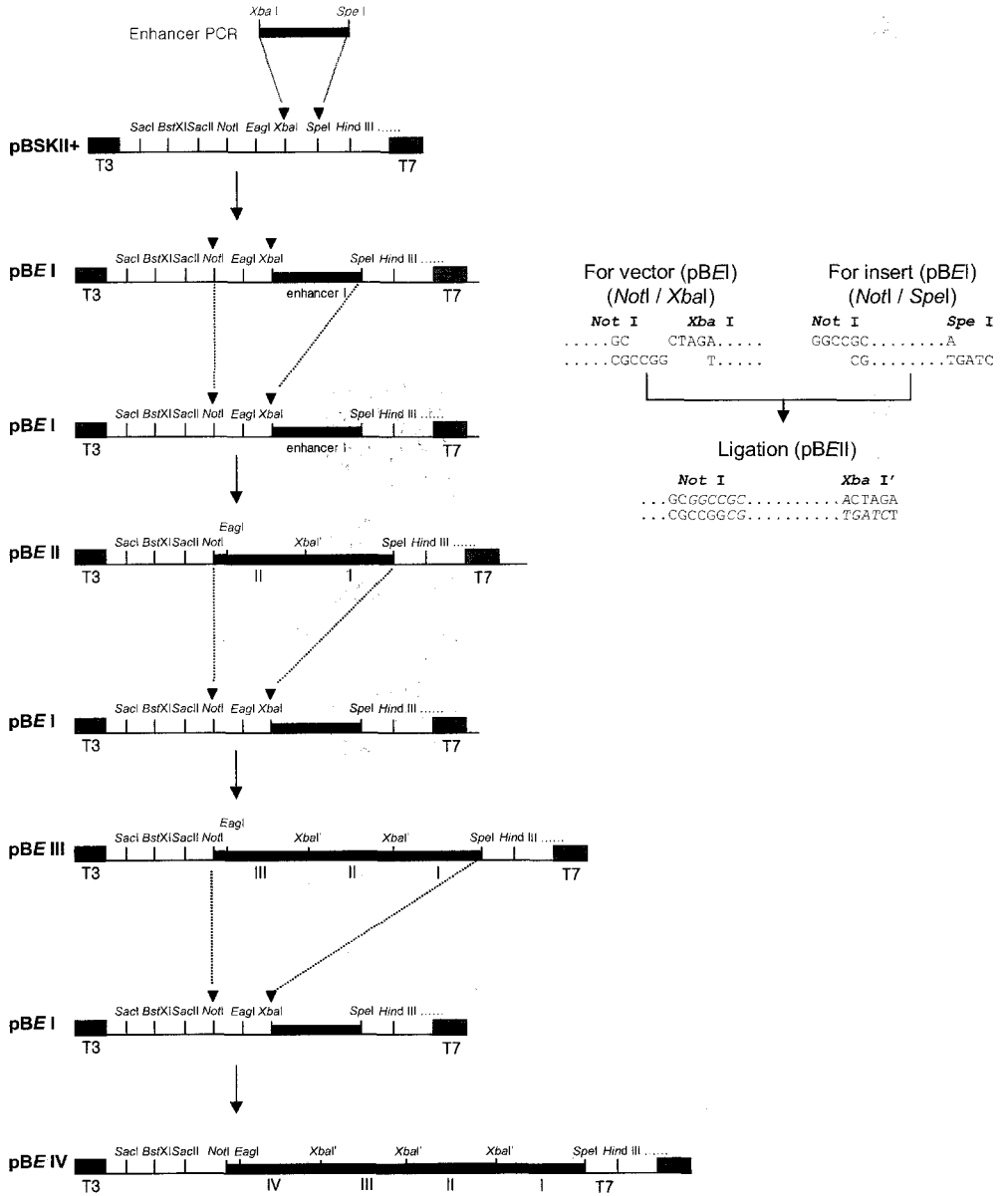


Fig. 2-42. Cloning of the CaMV 35S enhancer DNA fragment.

A, Nucleotide sequence of the CaMV 35S promoter and upstream region. The nucleotide sequence from -299 to +32 is shown. The transcription start site is designated +1. The underlined regions indicate the position of primers used for PCR amplification. B, Identification of pBE1. The 163 bp 35S enhancer sequence was cloned into pBluescriptII SK+ vector and digested with *Xba*I and *Spe*I.

A



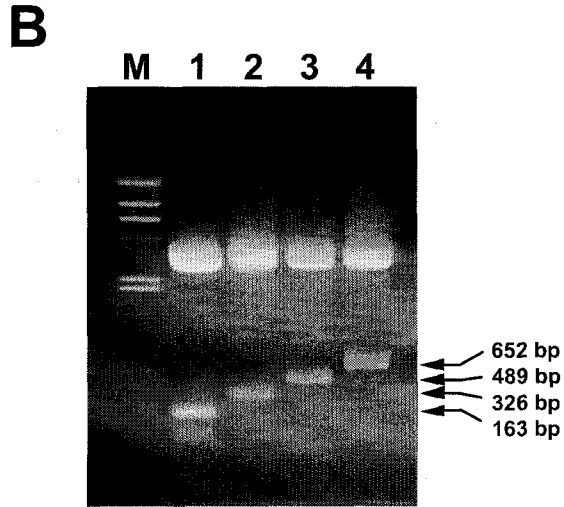


Fig. 2-43. Construction of multimerized enhancer sequences of the CaMV 35S promoter.

A, Schematic diagram for multimerized enhancer constructs. B, Identification of multimerized enhancer constructs. pBEI (lane 1), pBEII (lane 2), pBEIII (lane 3) and pBEIV (lane 4) DNA was digested with *Hind*III and separated on a 1.2% agarose gel.

(다) 발현 vector, pIG-*Epqr1.3*의 구축

pBpq2.5 DNA를 주형으로하여 *pqrA* 유전자를 포함하는 1.3 kb 단편을 PCR 증폭하였으며, 이때 5'-sense primer 내에는 *XbaI* site를 그리고 3'-antisense primer 내에는 *SacI* site를 각각 도입하였다. PCR 증폭산물을 *XbaI*과 *SacI*으로 절단한 다음, pIG121-Hm의 35S promoter 하류에 도입하여 발현 vector, pIG-pqr1.3을 구축하였다 (그림 2-44A). pIG-pqr1.3에 35S enhancer의 tetramer를 도입하기 위하여 pBEIV로부터 652 bp의 4×enhancer DNA 단편 (4×163 bp)을 회수한 다음, pIG-pqr1.3의 35S promoter의 상위에 도입하여 최종적으로 발현 vector, pIG-*Epqr1.3*을 구축하였다 (그림 2-44B).

나. *Agrobacterium*의 형질전환

제작된 발현 vector pIG-pqr2.1과 pIG-*Epqr1.3*을 Horsch 등 (1988)의 freeze-thaw 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101에 각각 형질전환하였다. 형질전환된 *Agrobacterium*으로부터 plasmid DNA를 분리하여 제한효소 분해 후 전기영동하여 발현 vector의 도입을 확인한 다음, 식물체 형질전환에 이용하였다.

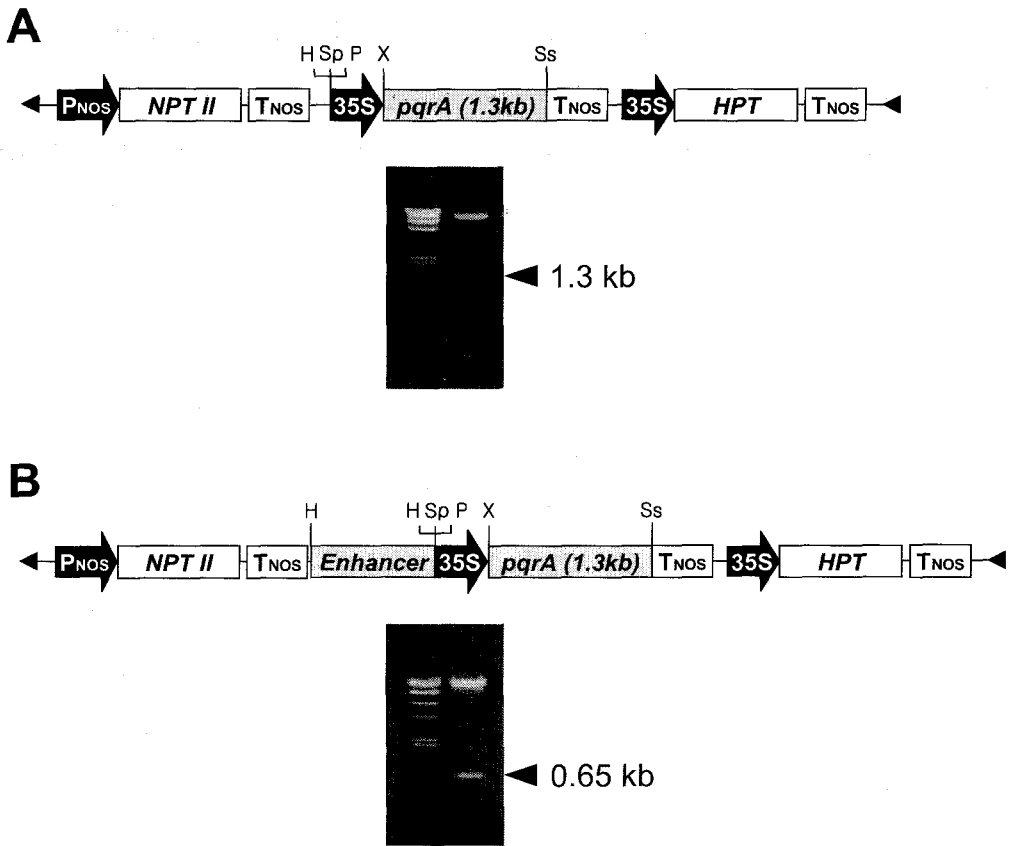


Fig. 2-44. Construction of the expression vector, pIG-pqr1.3 and pIG-Epqr1.3.

A, Structure and identification of pIG-pqr1.3. The 1.3 kb *pqrA* gene fragment was placed under the control of the CaMV 35S promoter. pIG-pqr1.3 DNA was digested with *Xba*I (X) and *Sac*I (Ss), and separated on 1.2% agarose gel. B, Structure and identification of pIG-Epqr1.3. The tetramer of 35S enhancer sequences was introduced into pIG-pqr1.3. pIG-Epqr1.3 DNA was digested with *Hind*III (H) and separated on 1.2% agarose gel.

다. *Agrobacterium*을 이용한 목초의 형질전환 및 확인

화본과 목초인 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스의 형질전환을 위하여 binary vector, pIG121-Hm의 35S promoter의 하류에 *pqrA* 유전자를 도입한 pIG-pqr2.1을 사용하였다. 또한, 형질전환 목초 내에서 *pqrA* 유전자의 발현량 증가를 위하여 35S promoter의 상위에 35S enhancer를 tetramer로 도입한 pIG-Epqr1.3도 형질전환하였다.

1) 형질전환 목초의 구축

pqrA 유전자를 이용한 형질전환 목초의 구축을 위하여 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스의 재분화 조건의 확립과정을 통하여 (제2장 4절-2) 캘러스 형성과 식물체 재분화 효율이 가장 높게 나타난 오차드그래스의 품종 중 Potomac과 이탈리아 라이그래스의 품종 중 Jeanne를 공시품종으로 사용하였다. 형질전환 과정의 배지조성 및 배양조건은 캘러스 유도 및 재분화 조건의 확립 (제2장 4절-2)에서 사용한 방법을 일부 변형하여 사용하였다.

(가) 캘러스 유도

오차드그래스 (cv. Potomac)와 이탈리아 라이그래스 (cv. Jeanne) 종자의 외영과 내영을 제거한 다음, 70% ethanol에 30초, 1% NaOCl에 50분간 살균한 다음 멸균수로 4회 이상 세정하였다. 종자를 MS 캘러스 유도배지 (MS basal; sucrose 30 g/l; 1 g/l casein hydrolysate; 1 mg/l thiamin-HCl; 0.25 g/l myo-inositol; 0.69 g/l proline; 1.25 mg/l cupric sulfate; 2 mg/l 2,4-D; 0.157 mg/l BAP; 5 g/l gelrite, pH 5.8)에 치상하여 25°C의 약한 광상태 (20 μ E)에서 배양하였다. 배양 2주 후에 종

자로부터 발아된 shoot와 root를 제거하고, 캘러스만을 취하여 다시 MS 캘러스 유도 배지에 옮겨 4주간 배양하여 캘러스의 증식을 유도하였다 (그림 2-45A and 그림 2-46A).

(나) 캘러스 전배양 (preculture)

MS 캘러스 유도배지에서 2~3회 계대배양한 캘러스를 직경 3-4 mm의 크기로 잘라 MS 캘러스 전배양배지 (MS 캘러스 유도배지에서 2,4-D를 1 mg/l로 줄이고 BAP를 0.785 mg/l로 늘림)로 옮겨 25°C의 약한 광상태 (20 μ E)에서 5일간 전배양 (preculture)한 다음, *Agrobacterium* 감염에 이용하였다.

(다) *Agrobacterium* 현탁액의 준비

pIG-pqr2.1과 pIG-Epqr1.3으로 각각 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101을 AB 한천배지 (Chilton 등, 1974)에 도말한 다음, 28°C, 암상태에서 3일간 배양하였다. 균체를 회수하여 100 μ M의 acetosyringone이 첨가된 MS 현탁배지 (MS 캘러스 전배양배지에서 gelrite를 첨가하지 않고 pH를 5.2로 조정)에 현탁 ($A_{600} = 0.4$) 하여 캘러스의 감염에 사용하였다.

(라) *Agrobacterium* 감염 및 공배양

전배양한 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스의 캘러스를 MS 현탁배지에 1시간 침지한 다음, 100 μ M의 acetosyringone이 첨가된 *Agrobacterium* 현탁액에 다시 1시간 침지하여 감염시켰다. *Agrobacterium* 감염된 캘러스를 MS 공배양배지 (MS 전배양배지의 pH를 5.2로 조정)에 치상하여 28°C, 암상태에서 3일간 배양하였다.

(마) 캘러스 선발

Agrobacterium 감염된 캘러스를 250 mg/l의 cefotaxime이 첨가된 멸균수로 2~3회 세정하여 여분의 *Agrobacterium*을 제거한 다음, MS 선발배지 (MS 전배양 배지에 250 mg/l의 cefotaxime과 25 mg/l hygromycin을 첨가)로 옮겨 25°C, 광상태 (40 μ E)에서 3주간 배양하였다. 이때 배양초기에는 캘러스의 증식억제와 갈변이 진행되는 현상을 나타내었으나 일부 캘러스의 경우 갈변된 캘러스의 세포로부터 hygromycin에 저항성을 나타내는 새로운 캘러스의 증식이 관찰되었다. 배양 3주 후, 캘러스를 새로운 MS 선발배지로 옮겨 동일한 조건으로 2주간 다시 계대배양하여 캘러스의 선발을 실시하였다 (그림 2-45B and 그림 2-46B).

(바) 식물체 재분화

2 단계에 걸친 선발과정을 통하여 hygromycin에 의해 갈변되어 고사하지 않고 저항성을 나타내는 캘러스를 MS 재분화배지 (MS basal; sucrose 20 g/l; maltose 20 g/l; sorbitol 20 g/l; 2.5 mg/l cupric sulfate; 1 mg/l NAA; 5 mg/l kinetin; 250 mg/l cefotaxime; 40 mg/l hygromycin; 5 g/l gelrite, pH 5.8)로 옮긴 다음, 25°C의 광상태 (40 μ E)에서 배양하여 shoot의 분화를 유도하였다. 그 결과, 배양 2주 후부터 녹점 (부정배)의 생성이 관찰되었으며, 배양 3~5주 경부터 shoot의 분화가 관찰되었다 (그림 2-45C and 그림 2-46C). Hygromycin이 첨가된 MS 재분화배지에서 3~5개 정도의 잎이 유도된 식물체는 호르몬을 첨가하지 않은 half-strength의 MS 배지로 옮겨 뿌리의 발육과 정상적인 식물체로의 생육을 유도하였다 (그림 2-45D and 그림 2-46D). 기내에서 지상부와 지하부가 완전히 전개된 식물체를 원예용 상토 (5호, 부농)를 담은 화분으로 옮겨 수분을 충분히 공급한 상태에서 랩으로 봉하여 일주일간 순화시킨 다음, 성장실로 옮겨 성장시켰다 (그림 2-45E and 그림 2-46E).

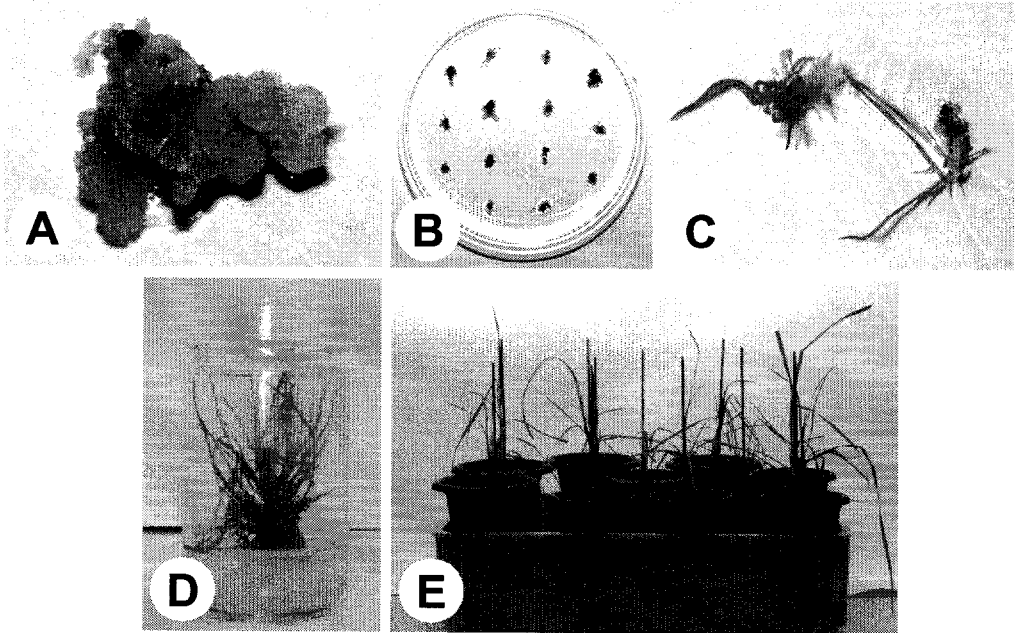


Fig. 2-45. Plant regeneration from seed-derived callus of orchardgrass transformed with *Agrobacterium tumefaciens*.

A, Seed-derived callus of orchardgrass. B, Hygromycin selection of transformed callus. C, Shoots induced in regeneration medium containing hygromycin after 3 weeks of culture. D, Hygromycin-resistant plantlets with roots and shoots. E, Transgenic orchardgrass cultivated in pot for 6 weeks.

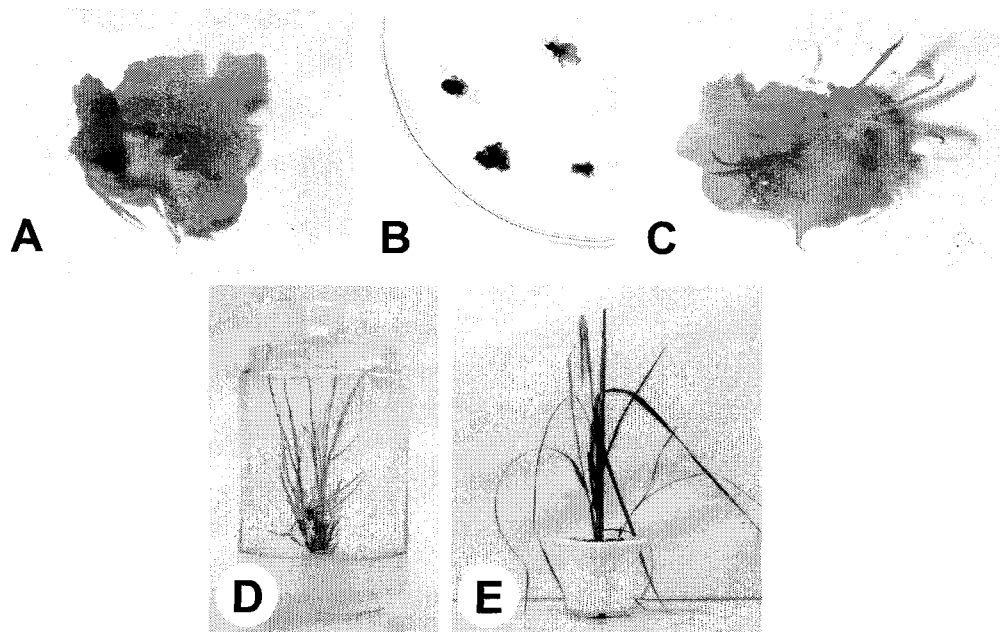


Fig. 2-46. Plant regeneration from seed-derived callus of Italian ryegrass transformed with *Agrobacterium tumefaciens*.

A, Seed-derived callus of Italian ryegrass. B, Hygromycin selection of transformed callus. C, Shoots induced in regeneration medium containing hygromycin after 3 weeks of culture. D, Hygromycin-resistant plantlets with roots and shoots. E, Transgenic Italian ryegrass cultivated in the pot for 6 weeks.

이와 같은 과정을 통하여 pIG-pqr2.1의 경우 오차드그래스에서 7개의 식물체를, 그리고 이탈리아 라이그래스에서 25개의 식물체를 얻었다. 또한 pIG-Epqr1.3의 경우 오차드그래스에서 5개의 식물체를, 그리고 이탈리아 라이그래스에서 22개의 식물체를 얻었다.

2) 형질전환 목초의 확인

재분화된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스의 잎으로부터 CTAB 방법으로 genomic DNA를 분리한 다음, 두 조합의 primer를 이용한 PCR 법으로 형질전환 여부를 확인하였다. 먼저, pIG-pqr2.1과 pIG-Epqr1.3으로 각각 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 모두 binary vector 내에 존재하는 *NPTII* 유전자의 염기서열에 근거하여 합성한 *NPTII* sense와 *NPTII* antisense primer 조합을 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과, 형질전환하지 않은 wild-type 목초에서는 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 모두 *NPTII* primers에 특이적인 증폭산물이 나타나지 않았으나, hygromycin이 첨가된 배지에서 재분화된 대부분의 목초에서는 예상 크기와 동일한 0.7 kb의 특이적인 PCR 증폭산물을 확인하였다 (그림 2-47B and 2-48B). 형질전환 여부를 다시 한번 확인하기 위하여, pIG-pqr2.1로 형질전환된 목초의 genomic DNA로부터 35S promoter와 *pqrA* 유전자에 특이적인 35Ss1과 pqrAas1 primer 조합을 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과, pIG-pqr2.1로 형질전환된 목초에서 wild-type에서는 나타나지 않는 0.8 kb의 35S promoter-*pqrA* 유전자 증폭산물을 확인하였다 (그림 2-47C). 또한, pIG-Epqr1.3로 형질전환된 목초의 경우 35S enhancer의 tetramer에 특이적인 35S-Es와 35S-Eas primer 조합을 이용하여 PCR 증폭을 실시한 결과, *NPTII* 유전자의 도입이 확인된 모든 목초에서 예상크기와 동일한 0.5 kb의 특이적인 PCR 증폭산물을 확인하였다 (그림 2-48C).

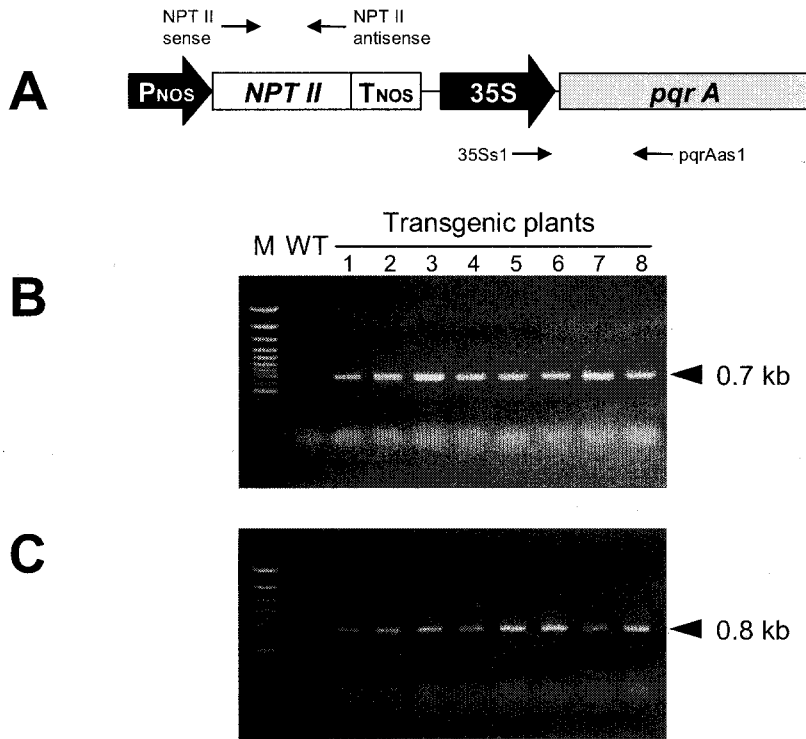


Fig. 2-47. PCR identification of regenerated plants transformed with pIG-pqr2.1.

A. Schematic diagram for PCR amplification of *NPTII* gene, 35S promoter and *pqrA* gene fragments.

B. PCR amplification with *NPTII* sense and *NPTII* antisense primers.

C. PCR amplification with 35Ss1 and pqrAas1 primers.

Numbers indicate independent transgenic lines.

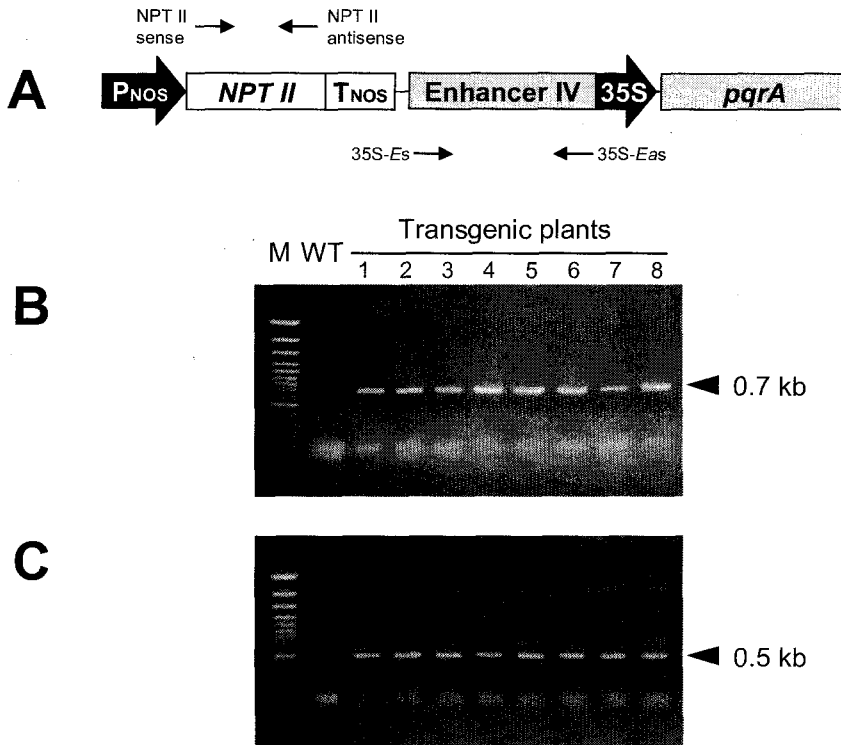


Fig. 2-48. PCR identification of regenerated plants transformed with pIG-*Epqr1.3*.

A. Schematic diagram for PCR amplification of *NPTII* gene, 35S enhancer DNA fragments.

B. PCR amplification with *NPTII* sense and *NPTII* antisense primers.

C. PCR amplification with 35S-*Es* and p35S-*Eas* primers.

Numbers indicate independent transgenic lines.

이와 같은 construct 별 2 조합의 PCR 분석을 통하여 최종적으로 pIG-pqr2.1으로 형질전환된 오차드그래스 5 개체와 이탈리아 라이그래스 20 개체를 선발하였으며, pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 오차드그래스 4 개체와 이탈리아 라이그래스 17 개체를 선발하였다.

3) 형질전환 목초 내에서 *pqrA* 유전자의 발현 확인

형질전환이 확인된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 내에서 paraquat 내성유전자 (*pqrA*)의 발현정도를 확인하기 위하여 wild-type과 형질전환 식물체의 잎으로부터 total RNA를 분리한 다음, *pqrA* 유전자 단편 (*orf1*)을 probe로 사용하여 northern blot 분석을 실시하였다.

(가) pIG-pqr2.1

먼저, CaMV 35S promoter가 부착된 pIG-pqr2.1로 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스를 분석한 결과 (그림 2-49), 두 목초 모두에서 형질전환하지 않은 wild-type 식물체의 경우 paraquat 내성유전자인 *pqrA*의 전사체가 전혀 나타나지 않았다. 그러나 형질전환이 확인된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스로부터 분리한 total RNA에서는 *pqrA* 전사체의 축적이 관찰되었다. *pqrA* 전사체의 축적량은 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스에서 모두 개체 간의 차이가 크게 나타났다. 형질전환 식물체 내에서 도입된 외래의 유전자가 발현량에 차이를 나타내는 원인은 담배의 형질전환에서 언급한 바와 같이 positioning effect (Kuhlemeier 등, 1987), co-suppression (Napoli 등, 1990), T-DNA insertion mutation (Feldman, 1991), gene dosage effects (homo- versus heterozygous individuals) 및 somaclonal variation (Larkin과 Scowcroft, 1981) 등에 기인하는 것으로 생각된다.

(나) pIG-Epqr1.3

형질전환 식물체 내에서 *pqrA* 유전자의 발현량을 증가시키기 위하여, CaMV 35S promoter의 상위에 35S enhancer의 tetramer를 부착한 pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스를 분석한 결과에서도 wild-type 식물체에서는 *pqrA*의 전사체가 전혀 나타나지 않았으나, 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스로부터 분리한 total RNA에서는 *pqrA* 전사체의 축적이 관찰되었다 (그림 2-50). 또한 pIG-pqr2.1에서와 마찬가지로 pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스에서도 개체 간에 *pqrA* 전사체의 축적량에 차이를 나타내었다.

pIG-pqr2.1로 형질전환된 목초 (그림 2-49)와 35S enhancer를 부착한 pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 목초 (그림 2-50)에서의 *pqrA* 전사체의 축적량을 비교한 결과, 두 그룹 사이에서 *pqrA* 유전자의 발현량의 차이가 관찰되었다. 즉, pIG-pqr2.1로 형질전환된 목초에 비하여 pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 목초에서의 *pqrA* 유전자의 발현량이 개체 간의 차이는 있지만, 약 2에서 3배 이상의 증가를 나타내었다. 그러나 Fang 등 (1989)이 35S enhancer의 multimerization에 의해 *GUS* 유전자의 발현량이 최대 4.7 배까지 증가한다는 보고에 비하여 *pqrA* 유전자의 발현량 증가는 낮은 수준을 나타내었다. 이러한 차이의 원인으로는 도입된 *pqrA* 유전자 산물의 기능이 세포막에서 ion pump 내지는 efflux 기능을 한다는 관점에서 보았을 때 이 단백질의 세포막에서의 과도한 축적은 세포에 negative 요인 즉, 세포 내의 ion balance의 파괴, 막을 통한 물질수송 저해 등으로 작용하여 생장에 오히려 해를 주어 실제로 발현량이 높은 형질전환 식물체가 완전한 식물체로 재분화되지 못하였을 가능성이 높다. 실제로 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스의 형질전환 과정에서 hygromycin이 첨가된 배지에서 형성된 초기 shoot이 정상적인 식물체로 분화되지 못하고 사멸하는 경우가 빈번히 관찰되었다.

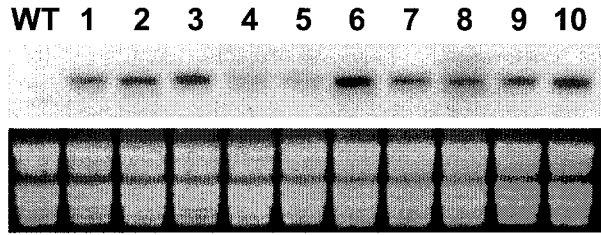


Fig. 2-49. Northern blot analysis of orchardgrass and Italian ryegrass transformed with pIG-pqr2.1.

Total RNA was isolated from the leaves of wild-type (WT) and transgenic orchardgrass (lane 1~5) and Italian ryegrass (lane 6~10). Numbers indicate independent transgenic lines. Each lane was loaded with 15 μg of total RNA. Transcripts were hybridized with ^{32}P -labeled *pqrA* DNA. The lower panel shows an ethidium bromide-stained gel of rRNAs.

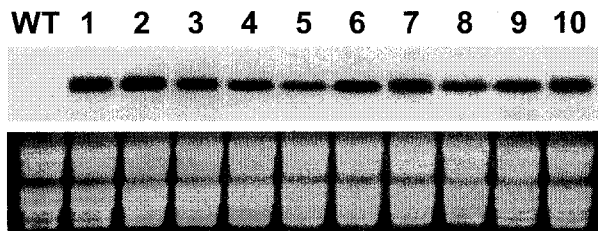


Fig. 2-50. Northern blot analysis of orchardgrass and Italian ryegrass transformed with pIG-Epqr1.3.

Total RNA was isolated from the leaves of wild-type (WT) and transgenic orchardgrass (lane 1~4) and Italian ryegrass (lane 5~10). Numbers indicate independent transgenic lines. Each lane was loaded with 15 μg of total RNA. Transcripts were hybridized with ^{32}P -labeled *pqrA* DNA. The lower panel shows an ethidium bromide-stained gel of rRNAs.

형질전환 과정에서 hygromycin이 첨가된 배지에서 재분화된 초기 shoot가 정상적인 식물체로 분화되지 못하고 고사하는 원인으로는 실제로는 형질전환되지 않은 상태에서 형성된 초기 shoot가 궁극적으로 hygromycin에 의해 고사되는 경우를 생각할 수도 있지만, *pqrA* 유전자 산물의 세포 내 과다축적에 의한 성장저해에 의한 결과일 수도 있다. 유사한 결과가 *pqrA* 유전자의 담배로의 형질전환에서도 관찰되었다.

라. Paraquat 내성의 조사

pIG-pqr2.1 및 pIG-Epqr1.3으로 형질전환이 확인된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스를 이용하여 paraquat 내성유전자인 *pqrA*의 발현과 발현량의 차이가 형질전환 식물체의 paraquat 내성에 미치는 영향을 조사하였다.

Paraquat 내성의 확인을 위하여 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 (T_0) 식물체를 기내에서 화분으로 옮겨 성장실에서 약 8~10 주간 성장시킨 다음, 완전히 전개된 잎을 3 cm 길이로 절취하여 사용하였다. 이때 대조구로는 동일령의 형질전환하지 않은 wild-type 식물체를 사용하였다. 직경 90 mm의 petri dish에 17 ml의 1% sucrose 용액을 분주한 다음, 최종농도 0, 10, 20, 50 및 100 μ M이 되도록 paraquat (methyl viologen, Sigma M2254)을 각각 첨가하였다. Paraquat이 첨가된 용액에 wild-type과 형질전환 식물체로부터 절취한 잎 절편을 넣어 25°C의 암상태에서 12시간 이상 정치하여 paraquat의 흡수를 유도한 다음, 25°C의 광상태로 옮겨 배양하였다. Paraquat에 대한 내성의 획득여부는 배양 72시간 후에 가시적으로 나타나는 피해의 정도로 관찰하였다 (그림 2-51).

그 결과, 형질전환하지 않은 wild-type 식물체의 잎 절편은 10, 20, 50 및 100 μ M의 모든 처리농도에서 배양 6~12시간 이후부터 paraquat에 의한 엽록소의 파괴 (necrosis)가 나타나기 시작하였으며, 처리 농도에 따라 배양 36~72시간 이후에는 완전히 탈색되어 고사하는 것으로 나타났다.

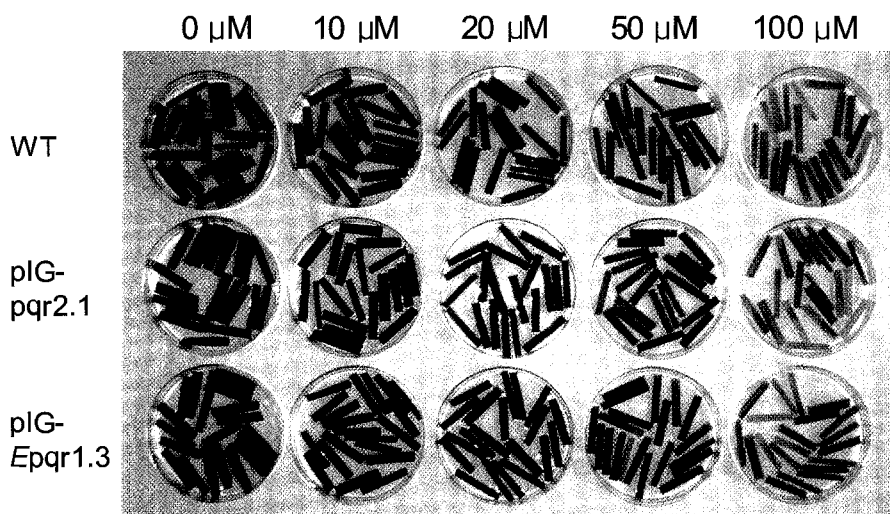


Fig. 2-51. Effect of paraquat concentration on the wild-type (WT) and transgenic (pIG-pqr2.1 and pIG-Epqr1.3) orchardgrass.

Leaf segments were subjected to the different concentration of paraquat solution in the dark for 12 h and then incubated in the light for 3 days.

pIG-pqr2.1과 pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스의 잎 절편은 10~20 μ M의 paraquat 농도에서 배양 3일째까지 가시적인 피해를 거의 나타내지 않았으며, paraquat을 첨가하지 않은 무처리구와 동일하게 녹색을 유지하여 paraquat에 대한 내성의 획득을 나타내었다. 한편, 50 μ M 이상의 paraquat 농도에서는 형질전환 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스의 잎 절편도 엽록소의 파괴에 따른 탈색현상을 나타내었으나, 형질전환하지 않은 wild-type과 비교하여 가시적인 피해의 진행속도는 지연되는 것으로 나타났다.

pqrA 유전자의 발현량의 차이에 따른 paraquat 내성의 획득정도를 pIG-pqr2.1과 pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스의 northern blot 분석 결과 (그림 2-49와 그림 2-50)와 비교하여 확인한 결과, *pqrA* 유전자의 발현량과 내성의 획득정도는 정의 상관관계를 나타내지 않았다 (그림 2-51). 즉, *pqrA* 유전자의 발현량 증가를 위하여 35S enhancer의 tetramer가 부착된 pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 목초와 35S enhancer를 부착하지 않은 pIG-pqr2.1로 형질전환된 목초에서의 paraquat 내성의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 형질전환 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스에서의 이러한 결과는 형질전환 담배에서 *pqrA* 유전자의 발현량과 paraquat 내성이 비례하는 결과와는 상반된 결과이다. 이러한 차이는 담배의 경우 homozygous line을 선발하여 유전적으로 균일한 상태의 식물체를 사용하여 분석한 반면에, 오차드그래스와 이탈리아그래스의 경우 춘화처리 후 채종까지 한 세대가 1년이 걸리는 어려움으로 인해 T₀ 세대의 heterozygous 식물체의 잎 절편을 사용한 것이 영향을 미친 결과로 생각된다. 따라서, 형질전환 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스의 homozygous line을 구축한 다음, 식물체 수준에서 paraquat 내성유전자인 *pqrA*의 발현량이 paraquat 내성에 미치는 영향과 궁극적인 내성의 획득정도를 규명하기 위하여 현재 T₀ 세대의 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스를 춘화처리 (vernalization) 후 T₁ 종자를 채종 중에 있다. 앞으로 T₁, T₂ 및 T₃ 세대의 형질전환 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스를 이용하여 hygromycin 선발, PCR 법을 이용한 *pqrA* 유전자의

유전양상 분석, RNA 및 단백질 수준에서의 *pqrA* 유전자의 세대별 발현양상 분석, 형질전환 목초의 세대별 및 line 별 paraquat 내성의 확인 등의 종합적인 분석을 통하여 최종적으로 paraquat에 내성을 가지는 paraquat 내성목초를 선발할 계획이다.

제5절 결론

Paraquat 내성유전자의 발현기구의 해명을 위하여 토양으로부터 선발한 paraquat 내성 미생물인 *Ochrobactrum anthropi* JW-2의 genomic DNA로부터 paraquat 내성 유전자 (*pqrA*)와 조절단백질 유전자 (*pqrR1*과 *pqrR2*)를 분리하여 그 특성을 규명하였다. Paraquat 내성유전자 (*pqrA*)를 모델식물인 담배에 형질전환한 다음, *pqrA* 유전자의 과발현에 의한 paraquat 내성의 획득을 확인하였다. Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 화본과 목초인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스의 캘러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립한 다음, *pqrA* 유전자를 형질전환하여 paraquat에 대한 내성의 획득을 확인하였으며, 이상의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Paraquat 내성유전자의 선발

토양으로부터 비선택성 제초제인 paraquat에 내성을 가지는 미생물 JW-2를 분리하였다. 분리한 미생물의 형태학적, 생리, 생화학적 특성 및 세포지방산 조성 등을 조사한 결과, 분리 균주 JW-2는 *Ochrobactrum anthropi*로 동정되었으며 최종적으로 *O. anthropi* JW-2로 명명하였다. Paraquat에 대한 내성을 대조균인 *E. coli* JM105와 비교하였을 때 paraquat 100 mM에서 *E. coli* JM105는 전혀 성장하지 못하였으나, *O. anthropi*는 paraquat 무침가구와 비교하였을 때 약 70% 정도까지 성장하였다.

Paraquat 처리시 대조균인 *E. coli* JM105는 superoxide dismutase (SOD)의 활성이 증가하였으나 *O. anthropi* JW-2는 SOD 활성의 변화를 나타내지 않아 paraquat에 대한 내성이 세포 내 항산화효소의 활성 증가에 의한 것이 아닌 다른 방어기작으로 인한 것임을 나타내었다. *O. anthropi* JW-2는 paraquat과 같은 redox-cycling compound인 plumbagin과 menadione에 대해서는 내성을 나타내지 않았으며, paraquat 이외의 다른 농약류에 대해서도 내성을 나타내지 않았다. 따라서, *O. anthropi* JW-2가 paraquat에 대하여 내성을 가지는 것은 세포막 단백질의 작용에 의해 paraquat이 세포 내로 유입되는 것을 선택적으로 저해하거나, 세포 내로 유입된 paraquat을 세포 외로 능동적으로 배출하는 작용에 의한 것으로 추정되었다.

O. anthropi JW-2의 genomic DNA library로부터 *E. coli*에 paraquat 내성을 부여하는 2.5 kb DNA 단편을 cloning하였다. 2.5 kb의 DNA 단편이 도입된 *E. coli*는 대조구보다 6배 이상 높은 paraquat 내성을 나타내었으며, 이 DNA 단편을 *pqr*로 명명하였다. *pqr* 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 총 길이는 2,520 bp였으며, 한 개의 완전한 ORF와 두 개의 불완전한 ORF로 구성되어 있었다. 발견된 한 개의 완전한 ORF인 *orf1* (position 643-1875)은 1,230 bp와 410개의 아미노산으로 구성되어 있었고 추정되는 단백질의 분자량은 42 kDa이었다. 또한 *orf1*의 5' 상류에는 원핵생물 유전자의 공통 promoter 서열인 TTGACA (-35)와 TTTAAT (-10)가 개시코돈 ATG로부터 각각 80 bp와 56 bp 상류영역에 존재하였으며, ribosome binding site (AAGGA)도 개시코돈으로부터 10 bp 상류영역에 존재하는 것으로 나타났다. 따라서, *orf1*을 *pqrA* 유전자로 명명하였고, 그 유전자 산물을 PqrA로 명명하였다.

2. Paraquat 내성유전자의 특성 및 발현기구 해명

PqrA 단백질은 hydrophobic 잔기가 전체 아미노산 잔기의 53%를 차지하였으며, 11개의 transmembrane helices 구조로 되어 있었다. 또한, helix 5와 6 사이에는

membrane의 cytoplasmic side로 추정되는 큰 hydrophilic loop가 있었다. BLAST system을 이용하여 PqrA의 아미노산 서열의 상동성을 검색해 본 결과, 약제 내성 및 transporter 단백질들과 상동성을 나타내었는데 특히, EmrB, SmvA, TetA 그리고 LmrP와 같은 membrane transporter로 기능하는 단백질들과 높은 상동성을 나타내었다.

pqrA 유전자를 도입한 *E. coli*의 활성산소 발생 억제들에 대한 특이성을 조사한 결과, menadione과 plumbagin에 대해서는 내성을 나타내지 않았다. 그러나 paraquat과 같은 pyridylum계 제초제인 diquat과 paraquat과 같은 양이온 화합물인 ethidium-bromide (EtBr)에 대해서는 내성을 나타내었다. PqrA의 *O. anthropi* JW-2에서의 존재 위치를 immunoblot 분석으로 조사한 결과 PqrA 단백질은 membrane fraction에서만 관찰되었다. 이상의 결과로부터 PqrA 단백질은 paraquat이 세포 내로 유입되는 것을 저해하거나 세포 내로 유입된 paraquat을 세포 밖으로 배출시킴으로써 paraquat 내성을 부여하는 것으로 판단되었다. *pqrA* 유전자의 발현 양상을 조사하기 위하여 paraquat을 처리한 다음 northern blot 분석을 실시한 결과, 발현량의 차이를 나타내지 않아서 *pqrA* 유전자가 paraquat에 의해 발현이 유도되는 것이 아니라 항상적으로 발현하는 유전자임을 알 수 있었다.

pqrA 유전자와 인접해있는 *orf2* 및 *orf3*의 full-length clone을 각각 분리한 다음, DNA 염기서열을 결정하여 분석한 결과, 이들은 미생물 유래의 transcriptional regulator 단백질들과 높은 상동성을 나타내었다. 따라서 이들 유전자들을 각각 *pqrR1* (*orf2*)과 *pqrR2* (*orf3*)로 명명하였다.

pqrA 유전자의 발현조절 기구의 해명을 위하여 *pqrA*, *pqrR1* 및 *pqrR2*의 각각의 유전자, 유전자 조합 및 deleted-sequences로 구성된 construct를 구축하여 *E. coli*에 형질전환한 다음, paraquat 처리 후 성장률을 조사하였다. 그 결과, *pqrR1* 및 *pqrR2* 산물은 paraquat 내성과는 직접적인 연관성이 없으며, *pqrA* 산물이 paraquat 내성에 직접 관여하는 것으로 나타났다. 또한, *pqrA* 유전자의 발현 조절에는 *pqrR1* 및

*pqrR2*가 직접 관여하지 않고 *pqrR1*의 partial sequence (2,383~2,875 bp)가 *pqrA* 유전자의 항상적인 발현과 이를 통한 paraquat 내성획득에 있어 enhancer sequence로서의 기능을 수행하는 것으로 추정되었다.

3. Paraquat 내성유전자의 모델 식물로의 도입 및 내성 획득

pqrA 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector인 pGA748의 CaMV 35S promoter 하류에 연결하여 모델식물인 담배에 형질전환하였다. Southern blot 분석을 실시하여 *pqrA* 유전자의 도입을 확인한 다음, northern blot 및 immunoblot 분석을 실시하여 형질전환 담배 내에서 *pqrA* 유전자가 정상적으로 전사 및 번역되어 아미노산 서열로부터 추정되는 분자량 42 kDa의 PqrA 단백질이 membrane fraction에 축적된다는 것을 확인하였다.

형질전환 및 도입된 유전자의 정상적인 발현이 확인된 T₀ 식물체의 자가수정을 통하여 T₁ 종자를 채종하였다. T₁ 종자의 kanamycin 감수성을 확인한 결과, 모든 개체가 3:1의 분리비를 나타내어 *pqrA* 유전자가 담배의 genome에 1 copy씩 도입되었음을 확인하였다. Homozygous line을 확립하고자 T₁ 식물체의 자가수정을 통하여 T₂ 종자를 채종하여 200 µg/ml의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 파종하여 kanamycin에 의해 고사하는 개체가 하나도 없는 line을 homozygote로 선발하였다. 이와 같은 homozygous line의 선발과정을 통하여 *pqrA* 유전자가 형질전환 담배 내에서 정상적으로 유전되어 발현된다는 것을 확인하였다.

T₂ homozygous line의 형질전환 담배를 이용하여 *pqrA* 유전자의 발현량과 paraquat에 대한 내성의 획득여부를 확인한 결과, 형질전환 식물체는 PqrA 단백질의 축적량에 따라 paraquat에 대한 내성의 획득 정도가 비례하여 증가하였으며, paraquat 처리 후 chlorophyll 함량을 기초로 비교하였을 때 형질전환하지 않은 wild-type 식물체에 비해 5배 이상의 내성 증가를 나타내었다. 또한, 식물의 잎, 줄기 및 뿌리 조직

의 northern blot 및 immunoblot 분석으로부터 *pqrA* 유전자는 조직 특이적으로 발현하는 것이 아니라 모든 조직에서 항상적으로 발현하고 있음을 확인하였으며, 광합성 기관인 잎에서와 마찬가지로 비광합성 기관인 뿌리에서도 paraquat에 대한 내성을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 *E. coli*에 paraquat 내성을 부여했던 *pqrA* 유전자는 고등식물에서도 정상적으로 발현되어 paraquat에 대한 내성을 부여한다는 것을 확인하였다. 또한, 고등식물 내에서도 미생물에서와 같이 PqrA 단백질이 membrane fraction에서 주로 축적되어 paraquat의 세포 내로의 유입의 차단 또는 유입된 paraquat의 세포 외로의 빠른 배출 작용으로 인하여 내성을 부여하는 transporter의 기능을 담당하는 것으로 추측되었다.

4. 목초 재분화계의 확립

Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 화본과 목초인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스를 선택하여 캘러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립하였다.

오차드그래스의 성숙종자 배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화의 품종간 차이를 조사한 결과, 공시품종 중 Potomac의 캘러스 생체중이 208 mg으로 가장 높았고, 식물체 재분화율도 28%로 가장 높게 조사되었다. 또한 캘러스 생체중이 무거운 품종에서 식물체 재분화 능력과 뿌리를 형성한 캘러스의 비율이 모두 높게 나타났다. 오차드그래스의 종자배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화를 위한 기본배지로는 MS 배지가 가장 효과적인 것으로 나타났다. 식물 성장조절제로는 캘러스 유도시에는 3 mg/l의 2,4-D가 가장 효과적이었고, 식물체 재분화에는 1 mg/l의 NAA와 5 mg/l의 kinetin 농도가 가장 효과적이었다.

이탈리안 라이그래스의 성숙종자 배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화의 품종간 차이를 조사한 결과, 공시품종 중 Jeanne의 캘러스 생체중이 17.6 mg으로 가장 높았고, 식물체 재분화율도 51%로 가장 높게 조사되었다. 이탈리아인 라이그래스의 종자배

양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화를 위한 기본배지로는 MS 배지가 가장 효과적인 것으로 나타났다. 식물 성장조절제로는 캘러스 유도시에는 2 mg/l의 2,4-D가 가장 효과적이었고, 식물체 재분화에는 1 mg/l의 NAA와 5 mg/l의 kinetin 농도가 가장 효과적이었다. 또한, 배지 내에 첨가되는 탄소원의 영향을 조사한 결과, sucrose가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

5. Paraquat 내성목초의 개발

Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 *pqrA* 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector인 pIG121-Hm의 CaMV 35S promoter 하류에 도입하여 pIG-pqr2.1을 구축하였다. 또한, 형질전환 목초 내에서 *pqrA* 유전자의 발현량을 증가시키기 위하여 *pqrA* 유전자를 35S promoter에 연결한 다음, 다시 35S enhancer sequence의 tetramer를 35S promoter 상위에 도입하여 pIG-*Epqr1.3*을 구축하였다. 구축된 construct를 각각 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101에 도입한 다음, 오차드그래스 (cv. Potomac)와 이탈리아인 라이그래스 (cv. Jeanne)의 형질전환에 이용하였다.

목초 재분화계의 확립과정에서 사용한 방법을 일부 변형하여 형질전환을 실시한 결과, pIG-pqr2.1의 경우 오차드그래스에서 7개의 식물체를, 그리고 이탈리아인 라이그래스에서 25개의 hygromycin 선발된 식물체를 얻었다. 또한 pIG-*Epqr1.3*의 경우 오차드그래스에서 5개의 식물체를, 그리고 이탈리아인 라이그래스에서 22개의 재분화된 식물체를 얻었다.

재분화된 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리한 다음, *NPTII* 유전자와 35S promoter 및 *pqrA* 유전자를 이용한 construct 별 두 조합의 PCR 분석을 실시하여, 최종적으로 pIG-pqr2.1으로 형질전환된 오차드그래스 5 개체와 이탈리아인 라이그래스 20 개체를 선발하였으며, pIG-*Epqr1.3*으로 형질전환된 오차드그래스 4 개체와 이탈리아인 라이그래스 17 개체를 선발하였다.

형질전환이 확인된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 내에서 *pqrA* 유전자의 발현정도를 확인하기 위하여 northern blot 분석을 실시한 결과, *pqrA* 유전자가 형질전환 목초 내에서 정상적으로 발현된다는 것을 확인하였으며, *pqrA* 유전자의 발현량은 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스에서 모두 개체 간의 차이가 크게 나타났다. 또한, pIG-pqr2.1로 형질전환된 목초에 비하여 pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 목초에서의 *pqrA* 유전자의 발현량이 개체 간의 차이는 있지만 약 2~3배 이상 높은 것으로 나타났다.

pqrA 유전자의 도입과 발현이 확인된 형질전환 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 (T_0)의 잎 절편을 이용하여 paraquat에 대한 내성의 획득여부를 확인한 결과, 형질전환 목초는 대조구인 wild-type에 비하여 최대 20 μ M의 paraquat 농도까지 내성의 획득을 나타내었다. 형질전환 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 (T_0)는 homozygous line을 구축하여 식물체 수준에서 paraquat 내성유전자인 *pqrA*의 발현이 paraquat 내성에 미치는 영향을 조사하고, 이를 통하여 궁극적으로 paraquat 내성목초를 선발하기 위하여 현재 춘화처리 (vernalization) 후 T_1 종자를 채종 중에 있다.

제 3 장 Paraquat의 토양 환경 중 동태

제1절 서 설

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride)은 1958년 Imperial Chemical Industries, Ltd (ICI) 사가 개발한 Gramoxone의 유효성분으로서 경엽처리로 신속하게 식물체 내에 흡수되어 제초효과를 나타내는 비선택성 제초제이다 (Kanazawa, 1990). 우리나라에는 1970년에 소개되어 1999년에 생산된 전체 제초제 유효성분량의 23%를 차지할 정도로 큰 비중을 갖고 있다 (농약공업협회, 2000). Paraquat은 건조상태에서는 강한 수용성을 갖는 chlorine 염의 형태인 반면 수용액 상태에서는 매우 안정된 2가 양이온의 형태로 존재하기 때문에 토양에 살포된 즉시 토양의 음전하 부분과 charge-transfer complex를 형성하여 강하게 흡착된 형태로 불활성화된다 (Akhaviein, 1966). Paraquat의 토양 중 흡착은 점토광물의 종류에 의하여 크게 좌우되고, 유기물 함량, 온도, 반응시간, pH 등의 요인들에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 토양의 paraquat 흡착 능력은 양이온 치환 용량 (CEC)의 약 10~30% 정도인 것으로 보고되어 있다 (Damanakis 등, 1970; Tüker 등, 1987).

Paraquat과 점토광물의 흡착형태는 H-type이지만 토양 유기물과의 흡착형태는 L-type으로 나타나 토양 유기물보다는 점토광물과 보다 강하게 결합한다는 것을 알 수 있다. 1996년도에 조사된 우리나라 과수재배 지역의 토양 중 paraquat의 존재형태는 대부분이 강하게 결합된 형태 (tightly bound)로 존재하며 약하게 결합된 형태는 검출되지 않은 것으로 나타났고, 1997년에는 paraquat이 잔류되어 있는 토양에 작물체를 재배하였을 경우 작물체에 미치는 영향과 지하수로의 용탈 가능성도 없는 것으로 나타나 우리나라의 토양환경 중에서도 paraquat은 아주 강하게 결합된 형태로 존재하는 것으로 조사되었다.

Paraquat은 토양과 강하게 흡착하기 때문에 미생물에 의한 분해가 어렵고, 쉽게 용탈되지 않으며 온도 및 증기압과 같은 환경적 요인들의 변화에도 상당히 안정하여 (Hance, 1987) 토양중 분해 반감기가 약 7년에서 10년 정도로 추정되고 있다 (Constenla 등, 1990). 또한 지금까지 조사된 바에 의하면 우리나라의 paraquat 사용 토양의 paraquat 잔류량은 전국 평균 8.0 ppm 정도인 것으로 조사되어 paraquat이 처리된 토양에 대부분의 paraquat이 그대로 잔존해 있는 것으로 나타났다. 그러나 paraquat을 연용하여 살포하였음에도 paraquat의 축적량이 예상 수준치 만큼 축적되지 않았고 또한 토양에 paraquat의 시용을 중단한 이후에 이들의 농도가 감소되는 것은 미생물에 의한 분해 가능성 및 탈착 가능성을 시사해 주는 것이라 하겠다.

따라서, 토양에 살포된 paraquat의 토양 구성 성분과의 결합 특성이 토양 중에서의 paraquat의 동태에 큰 영향을 끼치게 된다. 또한, 다른 연구보고에 따르면 토양으로부터의 탈착 가능성과 고농도로 paraquat을 처리한 토양에서 약해가 유발된다 (Kanazawa, 1990)는 결과가 보고된 바 있으므로 paraquat을 계속적으로 다량으로 사용한다면 언젠가는 환경오염 문제를 유발할 잠재적인 가능성을 가진다고 할 수 있을 것이다. 그러나 paraquat의 토양 환경 중 행동양상에 대한 연구는 아직 충분하지 못한 상태이기 때문에 paraquat으로 인해 발생할 우려가 있는 토양 환경 관련 문제들에 대한 신속한 대처는 어려울 듯하다.

우선 토양의 구성 성분과 paraquat의 결합특성을 알아보기 위해 유기물, 점토광물 및 토양시료를 흡착제로 사용하여 토양에 존재하는 여러 가지 양이온들이 존재할 경우, paraquat 흡착 및 탈착의 특성을 조사하고 토양의 수분함량에 따른 흡착량과 토양 유기물과 산화적 짝지움에 의한 결합 가능성을 조사하기 위해 산화·환원 효소를 이용하여 토양 부식물질의 말단을 형성하는 여러 가지 화합물과 반응시켰다.

한편, 토양에 유입된 paraquat은 토양과 강한 이온성 결합을 하여 존재하므로 토양 시료에 존재하는 paraquat 분석을 위해서는 paraquat을 탈착시키기 위해 강산으로 처리하여 수시간 동안의 환류과정을 거쳐야 하는데 이 추출과정에서 많은 시간과 에너지

지가 소모되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 토양에 강하게 결합되어 있는 paraquat의 분석시간을 단축시키는 것이 많은 시료를 분석하는 데 효율적일 것이다. Paraquat의 추출시간을 단축시키기 위하여 토양 중 paraquat 추출방법으로 사용되어 온 환류추출 방법을 대신하여 microwave를 사용한 추출 실험을 행하였다. 그리고 paraquat의 분해 정도를 평가하기 위한 연구의 일환으로서 강력한 산화력을 가지는 fenton 시약과 TiO_2 를 이용하여 수용액 중에서 paraquat의 분해 정도를 평가하고자 하였다.

또한 paraquat으로 인해 발생될 수 있는 토양환경 관련 문제들에 대한 대처방안을 모색하기 위하여 paraquat이 강하게 흡착되어 있는 토양에서 paraquat이 탈착되어 환경오염을 유발할 우려가 있는지를 여러 가지 조건에서 보다 구체적으로 밝히고 또한 흡착되어 있는 paraquat을 효과적으로 제거시킬 수 있는 방법에 대하여 연구하였다. α -Cyclodextrin에 의한 토양 중 paraquat의 제거 가능성을 바탕으로 흡착된 paraquat의 식물체로의 이행 가능성을 SAC-WB (strong adsorption capacity measured using wheat bioassay) 조사를 통하여 규명하고자 하였다. SAC-WB 조사란 토양 내 paraquat을 평형농도 (equilibrium solution)에 도달하도록 처리시 paraquat이 토양 내 강력하게 흡착하는 paraquat의 농도를 SAC (strong adsorption capacity)이라 정의하며, 이 때 평형에 도달한 농도에서 14일령의 밀의 뿌리에 대하여 paraquat 무처리와 비교시 50%의 뿌리 성장 저하를 나타낸 농도를 구하는 생물 검정을 실시하는 것을 말한다. 그리고 α -cyclodextrin을 이용하는 방법 이외에 가장 자연적인 방법을 이용하여 paraquat을 제거할 수 있는 방법을 모색하기 위하여 현재 비료로 사용하고 있는 ammonium thiosulfate를 이용한 paraquat 제거 양상과 SAC-WB (strong adsorption capacity measured using wheat bioassay) 조사를 통하여 ammonium thiosulfate (ATS)에 의해 제거된 paraquat의 식물체에 대한 영향을 규명하고자 하였다. 또한 실내 실험의 결과를 바탕으로 실제 토양 조건에서 ATS의 paraquat 제거 효과를 확인하기 위하여 실제 포장에서 동일한 실험을 실시하였다.

따라서, 본 연구는 토양 중에서 paraquat의 동태를 명확히 규명하기 위한 연구의

일환으로서 토양 중에서의 흡·탈착 양상과 paraquat으로 오염된 토양으로부터 식물체로의 이행 가능성과 그 화학적 복원방법에 대한 연구를 수행하였다.

제2절 Paraquat의 흡착양상

1. 서론

토양 중에서 paraquat의 동태를 명확히 규명하기 위한 연구의 일환으로서 토양의 구성 성분과 paraquat의 결합특성을 알아보기 위해 유기물, 점토광물 및 토양시료를 흡착제로 사용하여 토양에 존재하는 여러 가지 양이온들이 존재할 경우, paraquat 흡착 및 탈착의 특성을 조사하고 토양의 수분함량에 따른 흡착량과 토양 유기물과 산화적 짝지움에 의한 결합 가능성을 조사하기 위해 산화 환원 효소를 이용하여 토양 부식물질의 말단을 형성하는 여러 가지 화합물과 반응시켰다.

한편, 토양에 유입된 paraquat은 토양과 강한 이온성 결합을 하여 존재하므로 토양 시료에 존재하는 paraquat의 분석을 위해 paraquat을 탈착시키려면 강산으로 처리하여 수시간 동안의 환류과정을 거쳐야 하는데, 이 추출과정에서 많은 시간과 에너지가 소모되는 것으로 알려져 있다. 따라서 토양에 강하게 결합되어 있는 paraquat의 분석 시간을 단축시키는 것이 많은 시료를 분석하는 데 효율적일 것이다. 본 연구에서는 paraquat의 추출시간을 단축시키기 위하여 토양 중 paraquat 추출방법으로 사용되어 온 환류추출 방법을 대신하여 microwave를 사용한 추출 실험을 수행하였다. 그리고 paraquat의 분해 정도를 평가하기 위한 연구의 일환으로서 강력한 산화력을 가지는 fenton 시약과 TiO_2 를 이용하여 수용액 중에서 paraquat의 분해 정도를 평가하고자 하였다.

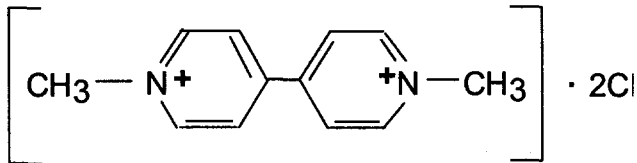
2. 재료 및 방법

가. 공시 약제

Paraquat 표준품 (99.7%)은 냉동고 (-20℃)에 보관하면서 필요한 농도로 희석하여 실험재료로 사용하였다. Paraquat의 물리·화학적 특성은 표 3-1과 같다.

Table 3-1. Physico-chemical properties of paraquat

Chemical structure :



$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_2$
Mol.wt.257.2

Chemical name : 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium

Solubility : In water ; *c.* 700 g/l

Practically insoluble in most other organic solvents.

Uses : Broad-spectrum control of broad-leave weeds and grasses in fruit orchards, plantation crops, etc. Also uses for general weed control on non-crop land.

Toxicology : Acute oral LD₅₀ for rats ; 157 mg/kg.
Lethal dose for man is *c.* 30 mg/kg

나. 흙착제

토양시료는 경북대학교 농과대학 실습 포장인 복현지역의 밭토양 (Soil A), 과수원 토양 (Soil C)과 경상북도 안심지역의 토양 (Soil B)을 채취하여 음지에서 풍건한 다

음 2 mm체를 통과시켜 공시 토양으로 사용하였으며 공시 토양의 물리·화학적 특성은 표 3-2와 같다. 유기물질은 Tan (1977)의 방법에 준하여 soil B로부터 humic acid와 fulvic acid를 분리하여 사용하였고, 점토광물로서는 2:1 팽창형 점토광물인 montmorillonite와 비팽창형 점토광물인 kaolinite를 사용하였으며 이들의 CEC (cmol/kg)는 각각 83.1 및 15.5로 조사되었다.

Table 3-2. Physico-chemical properties of soils

Soil	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	pH (1:5)	Organic matter (%)	CEC (me/100g)	Paraquat residue ($\mu\text{g/g}$)
Soil A	24.2	43.1	32.7	5.8	0.9	10.3	0
Soil B	27.2	43.8	28.9	7.3	4.7	18.1	0
Soil C	11.5	42.7	45.8	6.5	1.9	8.0	12*

* by reflux extraction

다. 흡착에 대한 공존 양이온의 영향

용액 중에 공존하는 양이온이 paraquat의 흡착에 미치는 영향을 조사하기 위하여 humic acid, fulvic acid, montmorillonite, kaolinite, soil A와 soil B 100 mg에 paraquat 표준 용액 5 ml를 첨가하고, Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} 또는 Fe^{3+} 이온을 각각 NaCl, NH_4Cl , CaCl_2 , MgCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 용액 (5 ml)의 형태로 paraquat²⁺와 동일 몰비로 첨가하여 흡착 평형시간 동안 왕복진탕한 후 원심분리하여 얻어진 상등액을 0.45 μm nylon filter를 이용하여 여과한 후 여액을 HPLC로 잔류량을 분석하였다. 정량분석시 HPLC의 기기조건은 표 3-3과 같다.

Table 3-3. The operating conditions of HPLC for paraquat determination

Model	: Young-In HPLC-9500
Detector	: UV 254 nm
Flow rate	: 1.0 ml/min
Column	: μ -Bondapak C ₁₈ (3.9 mm×300 mm)
Mobile phase	: Buffer solution (10 mM C ₈ H ₁₇ SO ₃ Na + 200 mM H ₃ PO ₄ + 100 mM (C ₂ H ₅) ₂ NH + CH ₃ CN (8:2, v/v)

라. 양이온 포화 흡착제에 의한 흡착 시험

양이온으로 포화된 흡착제에 대한 paraquat의 흡착 능력을 조사하기 위한 시험은 humic acid, fulvic acid, montmorillonite, kaolinite, soil A와 soil B에 대하여 CEC의 2배에 해당하는 NaCl, NH₄Cl, CaCl₂, MgCl₂, CuCl₂, FeCl₃ 용액 10 ml를 첨가하여 왕복 진탕하여 흡착제를 Na⁺, NH₄⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺ 또는 Fe³⁺이온으로 포화시킨 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전물에 paraquat (humic acid and fulvic acid, 515.0 ppm; montmorillonite, 1,030 ppm; kaolinite, 154.4 ppm; Soil A and Soil B, 77.5 ppm)를 첨가하여 흡착평형시간 동안 왕복진탕한 후 원심분리하여 얻어진 상등액을 0.45 μ m nylon filter를 이용하여 여과한 후 여액의 paraquat 잔류량을 HPLC로 분석하였으며 양이온으로 포화되지 않은 흡착제를 대조구로 사용하였다.

마. 포장용수량에 따른 paraquat의 흡착 경향

Soil A와 Soil B에 포장 용수량의 25, 50, 100, 200, 400, 500% 되도록 H₂O를 가하고, 흡착 시험시와 동일농도의 paraquat을 처리하여 흡착평형시간 동안 왕복진탕하여 흡착시킨 후 H₂O를 10 ml 가하여 2시간 왕복진탕한 후 원심분리하여 얻어진 상등액

을 0.45 μm nylon filter를 이용하여 여과한 후 여액의 paraquat 잔류량을 HPLC로 분석하였다.

바. Microwave를 이용한 토양에 결합된 paraquat의 추출

Paraquat을 10 ppm이 되게 처리한 토양 또는 paraquat의 시용으로 일정 수준의 paraquat이 잔류한다고 추측되는 토양시료 25 g에 65 ml의 H_2O , 35 ml의 18N- H_2SO_4 와 Octan-2-ol 1 ml를 가하고 5시간동안 환류추출 또는 microwave추출기 (Milestone 2000)를 사용하여 2 분간 250W, 2 분간 0W, 6 분간 250W, 5 분간 400W, 5 분간 600W의 microwave로 총 20 분간 추출하였다. 추출액은 glass-fiber filter를 통하여 흡인여과하고 여과액을 증류수를 사용하여 1 l로 희석한 후 양이온교환수지 (Dowex 50W-X8, H type, 100-200 mesh)로 정제하였다. 양이온교환수지는 NaOH 포화용액과 H_2O 를 이용하여 pre-conditioning하여 시료액을 양이온교환수지에 통과시킨 다음 50 ml의 H_2O , 25 ml의 2N-HCl, 25 ml의 H_2O , 100 ml의 2.5%- NH_4Cl , 25 ml의 H_2O 를 차례로 통과시켜 세척한 다음 양이온교환수지에 흡착된 불순물들을 제거하고 최종적으로 50 ml의 NH_4Cl , 포화용액으로 paraquat을 용출하였다. 용출액 50 ml에 환원발색시약 (sodium sulfate)으로 환원, 생성된 남색의 free radical을 분광광도계 (Shimadzu Model 160A UV/VIS spectrophotometer)로 정량하였다.

사. 산화·환원 효소에 의한 humic monomer와의 반응성

15 ml vessel에 0.2 mM paraquat 표준용액 5 ml를 넣고 humic monomers (catechol, protocatechuic acid, hydroquinone, caffeic acid, syringaldehyde, pyrogallol, vanillic acid)를 0.2 mM 또는 2 mM 되도록 처리한 반응액에 6.5 unit/ml laccase를 넣어 25°C의 진탕배양기에서 반응시켰다. 대조구로는 laccase를 넣지 않은 것으로 하

였다. 24 시간 반응시킨 후 35% HCl 100 μ l를 가하여 반응을 정지시키고 0.45 μ m nylon filter를 이용하여 여과한 후 여액의 paraquat 잔류량을 HPLC로 분석하였다. 사용된 laccase의 활성은 25 $^{\circ}$ C, phosphate buffer (pH 7.0)에서 0.01 mM 2,6-dimethoxy phenol을 기질로 468 nm의 파장에서 10초 간격으로 흡광도를 측정하여 10초 동안 0.001의 흡광도의 변화를 야기시키는 양을 1 unit로 하였다. 흡광도는 UV spectrophotometer로 측정하였다.

아. 수용액 내에서 fenton 시약에 의한 분해

15 ml vessel에 paraquat 표준용액 5 ml를 넣고 0.04 M FeCl₃와 30% H₂O₂를 일정 수준으로 첨가한 반응액을 암조건과 ultraviolet lamp (UVM-57, UVP)에 의한 UV광 (365 nm)이 조사되는 조건에서 일정시간 반응시켰다. 대조구로는 FeCl₃ 수용액과 30% H₂O₂를 넣지 않은 반응액으로 하고 일정시간 반응시킨 후 더 이상의 산화를 막기 위해 methanol 50 μ l를 반응액에 주입하였다. 이것을 0.45 μ m nylon filter를 이용하여 여과한 후 여액의 paraquat 잔류량을 HPLC로 분석하였다.

자. 수용액 내에서 TiO₂에 의한 분해

15 ml vessel에 paraquat 표준용액 5 ml를 넣고 TiO₂ 0.005 g과 30% H₂O₂를 0.035 M 되도록 첨가한 반응액을 암조건과 ultraviolet lamp에 의한 UV광 (365 nm)이 조사되는 조건에서 일정시간 반응시켰다. 대조구로는 TiO₂를 넣지 않은 반응액으로 하고 일정시간 반응시킨 후 더 이상의 산화를 막기 위해 methanol 50 μ l를 반응액에 주입하였다. 이것을 0.45 μ m nylon filter를 이용하여 여과한 후 여액의 paraquat 잔류량을 HPLC로 분석하였다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 흡착에 대한 공존 양이온의 영향

용액 중에서 paraquat이 다른 양이온들과 공존하는 조건에서 각각의 흡착제에 대한 paraquat의 흡착량을 조사한 결과는 표 3-4와 같다. 각각의 흡착제에서 paraquat의 흡착에 미치는 경쟁 양이온의 영향은 유기물, 토양 시료, 점토광물의 순으로 나타났으며, montmorillonite와 kaolinite의 경우 시험에 사용된 경쟁 양이온의 종류에 관계없이 87-99%로 paraquat의 높은 흡착률을 나타내었다. 동일한 흡착제에서 같은 하전수의 경쟁 양이온 종류에 따른 차이는 나타나지 않았고, 공존 양이온의 하전수에 따른 경쟁성의 차이도 나타나지 않았다. Humic acid와 fulvic acid가 흡착제로 존재할 경우 Na^+ , Ca^{2+} 또는 Cu^{2+} 이온은 paraquat의 흡착에 상당한 영향을 주는 것으로 나타났다. 유기물의 경우 Fe^{3+} 의 경우를 제외하면 경쟁 양이온이 있으면 흡착률이 점토광물에 비하여 크게 낮는데 이는 유기물은 carboxyl, phenolic, enolic hydroxyl, nitrogen기 등 다양한 종류의 음이온 작용기 또는 비공유 전자쌍을 가지고 있지만 (Best, 1972) 한 종류의 음이온 작용기를 가지는 점토광물에 비해 매우 낮은 하전밀도를 가지고 있기 때문인 것으로 추정된다 (Burns 등, 1973a, 1973b). 토양시료 soil A와 soil B에 대한 흡착은 75-99%였고, 같은 종류의 양이온이 존재할 경우 soil A와 soil B에서 paraquat의 흡착률에는 거의 차이가 없었다. 그리고 soil A와 soil B에 대한 흡착이 유기물과 점토광물의 중간정도의 영향을 받는 현상은 실험에서 흡착제의 양을 모두 동량으로 행하였으므로 토양시료 내의 유기물과 점토광물의 양이 상대적으로 적은 것에 기인하는 것으로 사료된다.

Table 3-4. Effect of competitive cations on paraquat adsorption

Adsorbents	Paraquat cation amount added (μmol)	Adsorption ratio of paraquat (%)						
		Competition cation						
		Control ^a	NH_4^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cu^{2+}	Fe^{3+}
Soil A	3	100	77	76	75	75	99	99
Soil B	3	100	77	79	80	77	99	99
Humic acid	20	100	65	N.D ^b	N.D	67	N.D	87
Fulvic acid	20	100	66	N.D	N.D	67	N.D	90
Montmorillonite	40	100	99	99	99	99	99	99
Kaolinite	6	100	87	89	89	87	99	99

^a : added paraquat only, ^b : not determined

나. 양이온 포화 흡착제에 의한 흡착 시험

양이온으로 포화되어 있는 흡착제에 대한 paraquat의 흡착 시험 결과는 표 3-5와 같다. Paraquat의 흡착 정도는 흡착제의 종류에 따라 다르나 모든 흡착제에서 대조구에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으며, 동일한 흡착제에 있어서 포화된 양이온의 종류에 따른 흡착량의 차이는 나타나지 않았다. 점토광물은 양이온으로 포화된 경우에 43-99%로 유기물이나 토양 시료에 비하여 비교적 높은 흡착률을 보여 주었다. 이는 점토광물에 대한 paraquat의 강한 흡착 특이성을 나타내어 주는 현상이다 (Weber 등, 1965; Knigh and Tomlinson, 1967). 하지만 humic acid와 fulvic acid가 Na^+ , Ca^{2+} 또는 Fe^{3+} 로 포화되었을 경우 paraquat은 Na^+ , Ca^{2+} 또는 Fe^{3+} 와 치환되어 흡착되지 않았다. Soil A와 soil B에서는 양이온의 종류에 따라 30-99%의 흡착량을 나타내었다. 따라서 유기물이 풍부한 토양에 살포된 paraquat은 유리된 상태로 존재할 가능성이 더 높은 것으로 추측된다.

Table 3-5. Adsorption of paraquat on cation-saturated adsorbents

Adsorbents	Adsorption ratio of paraquat (%)						
	Saturated cation						
	Control ^a	NH ₄ ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cu ²⁺	Fe ³⁺
Soil A	100	38	37	40	35	99	99
Soil B	100	31	35	34	30	69	99
Humic acid	100	25	N.D ^b	N.D	24	23	N.D
Fulvic acid	100	23	N.D	N.D	26	32	N.D
Montmorillonite	100	71	72	73	71	63	77
Kaolinite	100	45	45	43	44	53	99

^a : not saturated with cation, ^b : not determined

다. 포장용수량에 따른 paraquat의 흡착 경향

포장용수량에 따른 paraquat의 흡착 경향 시험 결과는 표 3-6과 같다. 포장용수량을 25, 50, 100, 200, 400, 500%로 했을 경우, 포장용수량에 관계없이 paraquat은 soil A와 B에 모두 흡착되었다. 따라서 토양 수분함량은 흡착에 어떠한 영향도 끼치지 않는 것으로 생각된다.

Table 3-6. Adsorption of paraquat on soil with the different field moisture capacity

Adsorbents	Adsorption ratio of paraquat (%)					
	Field moisture capacity (%)					
	25	50	100	200	400	500
Soil A	99	99	99	99	99	99
Soil B	99	99	99	99	99	99

라. Microwave를 이용한 토양에 결합된 paraquat의 추출

Microwave를 이용한 토양에 결합된 paraquat의 추출에 대한 시험 결과는 표 3-7과 같다. 토양에 10 ppm 수준으로 paraquat을 처리해서 환류와 microwave로 추출하는 방법으로 회수율 시험을 한 결과, microwave로 추출할 경우가 환류하여 추출하는 경우보다 추출에 걸린 시간은 각각 20분, 300분으로 microwave로 추출할 경우가 환류하여 추출하는 경우보다 15배나 단축되었고, 회수율은 각각 96%, 81%로 약 1.2배 높은 수준으로 나타났다. Paraquat을 시용해서 일정 수준의 paraquat이 잔류한다고 추측되는 토양으로 시험한 결과는 표 3-8과 같다. 각각 13 ppm, 12 ppm 으로 microwave로 추출할 경우가 환류하여 추출하는 경우보다 더 높은 농도로 추출되었다. 같은 추출용매를 사용하였지만 환류추출 보다 microwave에 의한 추출효율이 높은 것은 환류추출이 추출용매의 가열에만 의존하는 것에 반해 microwave는 추출용매의 가열효과 뿐만 아니라 microwave가 추출시료에도 직접 영향을 끼치고 밀폐된 반응용기 내에서 높은 압력하에서 추출용매를 시료와 반응하게 하기 때문일 것으로 사료된다.

Table 3-7. Recoveries of paraquat from soil A fortified with paraquat by different extraction methods

Extraction type	Paraquat conc. ($\mu\text{g/g}$)
Reflux	12 ± 0.2
Microwave	13 ± 0.2

Table 3-8. Extraction efficiencies of paraquat from soil C by two extraction methods

Paraquat conc. ($\mu\text{g/g}$)	Extraction type	Extraction time (min)	Recoveries (%)
10	Reflux	300	81 ± 0.5
	Microwave	20	96 ± 1.4

마. 산화·환원 효소에 의한 humic monomer와의 반응성

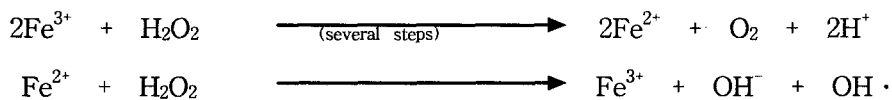
토양 환경에 유입된 농약이 비가역적으로 토양 유기물과 결합하는 반응을 할 수도 있는데 이 반응은 여러 가지 생물·물리·화학적 인자에 의해 촉매된다. 그 중에서 생물적 인자 중 산화·환원 효소에 의해 증대되는 산화적 짝지움 반응은 이러한 반응에 상당부분을 차지하는 것으로 이미 보고된 바 있다 (Dec and Bollag, 1990). 하지만 실제로 부식물질과 같은 토양유기물은 복잡한 형태의 물질이므로 부식물질에 대한 농약의 결합을 조사하기란 매우 힘든 작업이다. 이런 이유로 이와 관련된 연구들은 대부분 부식물질의 관능기로 알려진 caboxyl, hydroxyl기 등을 가지고 있는 화합물, 즉 humic monomer를 사용하여 산화 환원 효소로 알려진 laccase를 촉매로 하는 산화적 짝지움 반응성을 조사하였다 (Simmons 등, 1988). 표 3-9에서와 같이 paraquat (0.2 mM)은 단독으로 반응했을 경우 laccase에 의한 전환은 이루어지지 않았고, laccase에 의해 친전자체 혹은 친핵체로 작용하여, 반응을 촉진시킬 수 있는 catechol, protocatechuic acid, hydroquinone, caffeic acid, syringaldehyde, pyrogallol, vanillic acid와 같은 humic monomers가 존재할 경우, humic monomers의 농도가 0.2 mM 또는 2.0 mM일 때, 거의 반응성이 없었다. 산화·환원 효소에 의한 산화적 짝지움 반응은 그 효소에 의해 화합물이 free radicals이나 quinones, benzoquinone imines로 산화되어 결국 서로 cross-coupling되거나 친전자성 치환반응으로 중합을 하게 되는데 (Tatsumi 등, 1994), 이 반응에서 paraquat의 경우에는 구조적 특성상 수용액 상에서 매우 안정한 형태로 존재하므로 paraquat보다 불안정한 화합물인 humic monomers가 산화·환원 효소에 의해 산화되어 친전자체로 변하고, 이러한 친전자체에 대해 paraquat은 불활성으로 작용하여 humic monomers과의 반응이 일어나지 않은 것으로 사료된다. 따라서 토양 환경 중에서 이러한 산화·환원 효소에 의한 토양 유기물과의 결합가능성은 적다고 사료되어진다.

Table 3-9. Transformation of paraquat (0.2 mM) with humic monomers by laccase

Humic monomers	Transformed rate (%)	
	Humic monomers conc. (mM)	
	0.2	2
Control	-	-
Catechol	1	0
Vanillic acid	7	2
Caffeic acid	1	3
Pyrogallol	1	0
Hydroquinone	0	0
Syringaldehyde	0	0
Protocatechuic acid	2	5

바. 수용액 내에서 fenton 시약에 의한 분해

Fenton 반응은 Fe^{3+} 와 H_2O_2 가 반응하여 강력한 산화효과를 나타내는 반응으로서 hydroxyl radical에 의해 반응성을 나타낸다.



그리고 이 반응은 300 nm 이상의 UV 파장에서 더욱 강한 산화효과를 나타낸다고 알려져 왔는데 (Pignatello, 1992; Sun and Pignatello, 1993), 이를 이용한 polychlorinated dibenzodioxins, dibenzofurans 그리고 halogenated aliphatic compounds의 분해실험에 대한 결과가 보고된 바 있다 (Pignatello and Huang, 1993).

Fenton 시약으로 처리한 동시에 UV를 조사한 경우, paraquat의 분해반응은 24시간 이내에 종결되었다 (그림 3-1). 그리고 paraquat의 농도에 따른 반응시험 결과는

표 3-10과 같다. 모든 농도의 경우, 암조건이나 UV 광이 조사되는 조건에서 24 시간 반응시켰을 때, 0.04 M Fe^{3+} 25 μl 를 주입한 반응구에서는 paraquat의 농도 변화가 보이지 않았다. Fe^{3+} 와 30% H_2O_2 3 μl 가 함께 처리된 반응구를 암조건에서 반응시킨 경우에는 10 ppm, 100 ppm, 200 ppm 수준의 paraquat의 51-69%가 분해되었고, 500 ppm 수준일 때는 거의 분해되지 않았다. Larson 등의 실험에서 Fe^{3+} 를 H_2O_2 없이 UV가 조사되는 반응구에 처리하였을 경우, 상당량의 triazine계 농약의 분해를 관찰한 바 있지만 (Larson 등, 1991), 본 실험에서 Fe^{3+} 만 처리한 반응구는 UV광이 조사되는 조건에서도 paraquat은 변화가 없었다. Fe^{3+} 와 H_2O_2 가 함께 처리된 반응구는 UV광이 조사되는 조건에서 10 ppm, 100 ppm의 paraquat는 90%이상 분해되었고, 200 ppm일 경우 79%, 500 ppm의 경우 60%의 분해율을 나타내었다. Paraquat을 단독으로 UV광이 조사되는 조건에서 반응시킨 경우 paraquat의 농도에는 변화가 없었다. Paraquat의 농도 (10, 100, 200, 500 ppm)와 Fe^{3+} 의 농도 (0.2, 0.4, 0.8 ppm), H_2O_2 의 농도 (0.035, 0.070, 0.140 M)를 달리하여 암조건과 UV가 조사되는 조건에서 반응시킨 결과 암조건에서는 Fe^{3+} 의 농도가 높아질수록 분해율이 증가하고 paraquat의 농도와 H_2O_2 의 농도에 따른 분해율의 차이는 나타나지 않았다 (그림 3-2). UV가 조사되는 반응조건에서는 같은 농도로 처리했을 경우 훨씬 높은 분해율을 보이고 0.2 mM의 Fe^{3+} 를 처리했을 경우에만 paraquat의 농도가 높을수록 분해율이 감소하였다 (그림 3-3). 암조건과 마찬가지로 H_2O_2 의 농도에 따른 분해율의 차이는 나타나지 않았다. 실제로 그 반응성을 확인하기 위하여 시간에 따른 분해 양상을 살펴본 결과 암조건에서 0.1 M paraquat를 처리했을 때, 0.035 M의 H_2O_2 와 Fe^{3+} 를 0.2, 0.4, 0.8 mM 처리했을 경우, paraquat의 분해반감기는 63시간, 8시간, 20분으로 각각 나타났고 (그림 3-4), UV를 조사한 반응조건에서는 5시간, 5시간 20분으로 더 신속하게 분해되는 것으로 나타났다 (그림 3-5). Hydroxyl radical의 생성에 의해 paraquat의 분해가 이루어지는지를 조사하기 위하여 hydroxyl radical과 같은 free radical들을 제거하는 것으로 알려진 mannitol을 첨가하여 (Misra and Fridovich, 1976; Gutteridge and Halliwell, 1982;

Pignatello and Chapa, 1994) 반응을 조사한 결과 암조건에서 0.1 M paraquat 수용액에 0.02, 0.2 M mannitol 그리고 0.035 M의 H_2O_2 과 0.2, 0.4, 0.8 mM의 Fe^{3+} 를 처리했을 경우, paraquat의 분해반감기는 0.02 M의 mannitol이 존재할 경우, Fe^{3+} 의 농도가 높아짐에 따라 paraquat의 분해반감기는 290, 23, 5시간, 0.02 M의 mannitol이 존재할 경우, 267, 115, 11시간으로 나타났다. 따라서 fenton 시약과 UV에 의한 paraquat의 분해반응은 hydrogen peroxide에서 생성된 hydroxyl radical에 의하여 발생함을 알 수 있었다 (표 3-11).

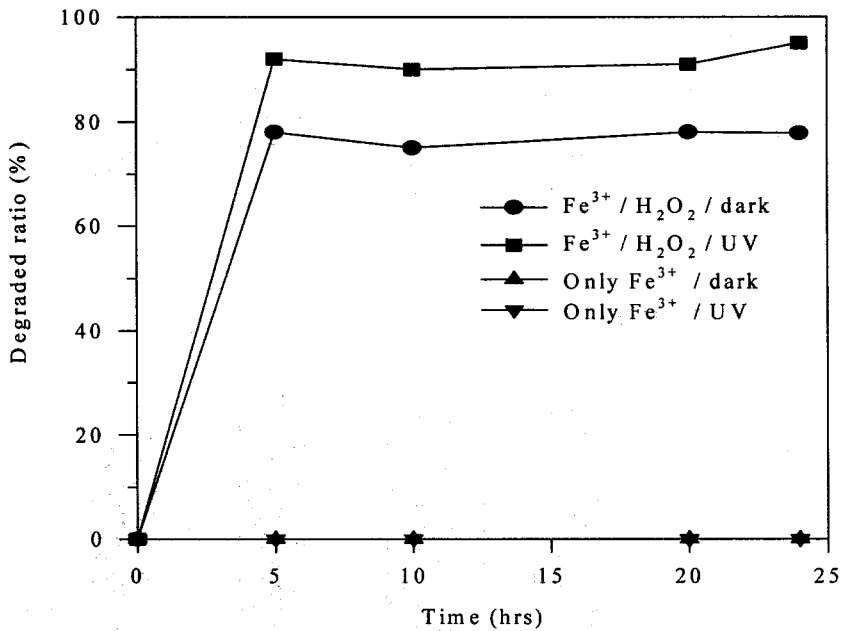


Fig. 3-1. Time course for degradation of paraquat (500 mg/l) by Fenton reagent (0.8 mM Fe^{3+} /0.140 M H_2O_2)

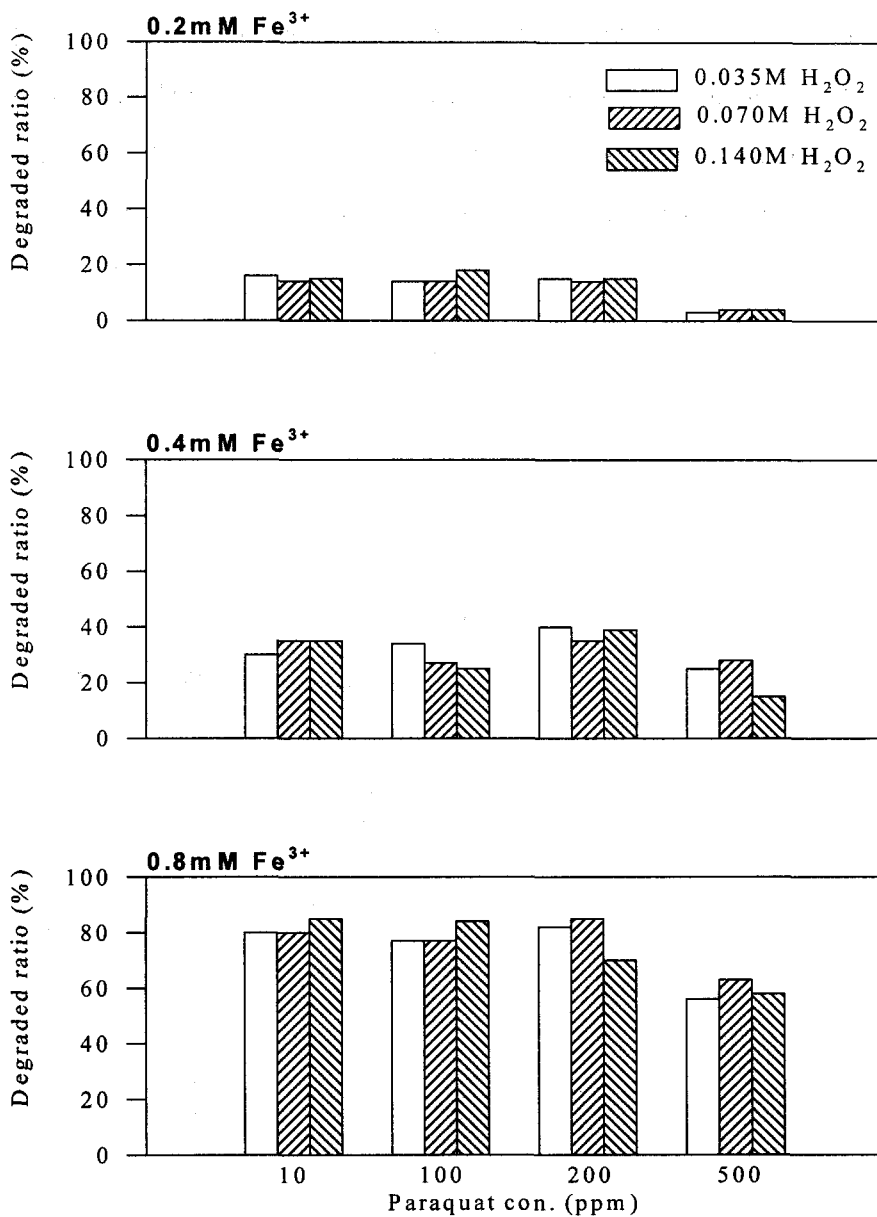


Fig. 3-2. Degradation of paraquat by different concentrations of Fe^{3+} and H_2O_2 under dark condition.

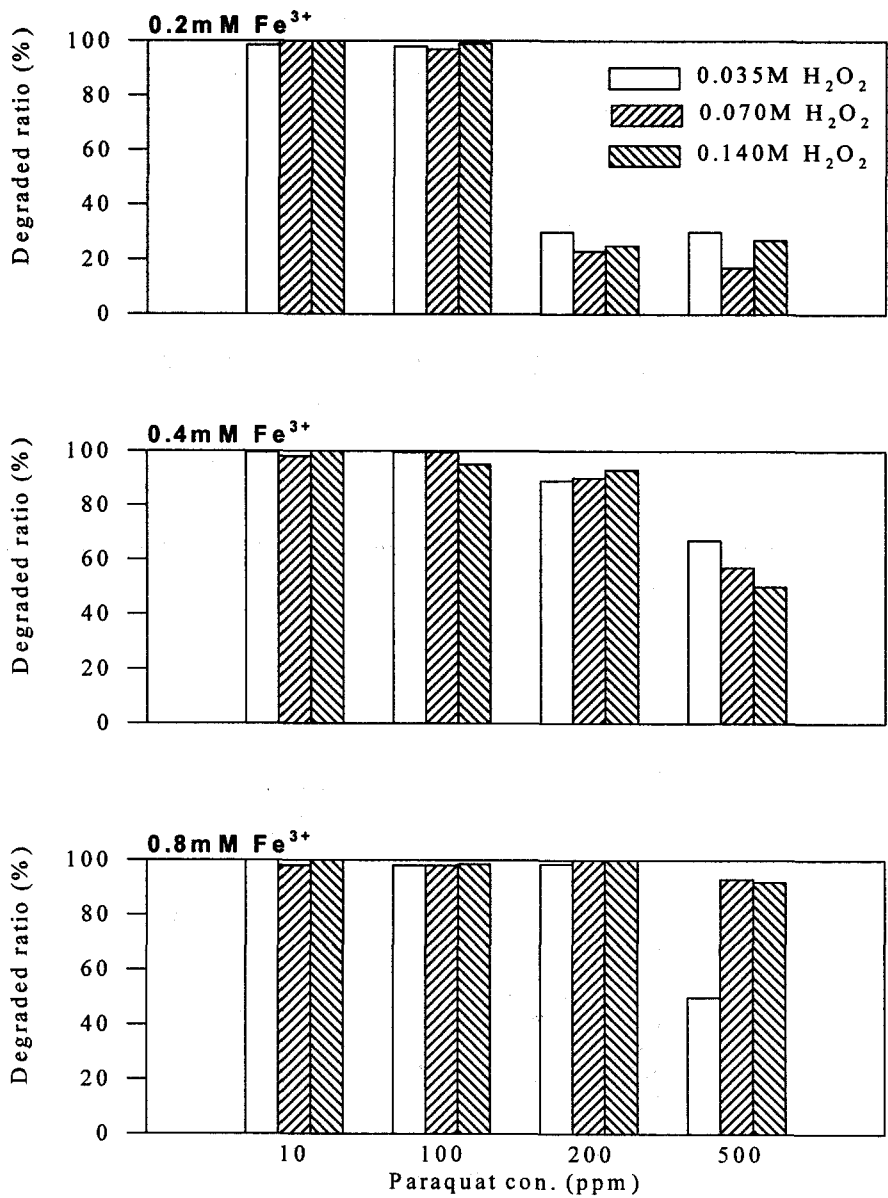


Fig. 3-3. Degradation of paraquat by different concentrations of Fe^{3+} and H_2O_2 under UV irradiation.

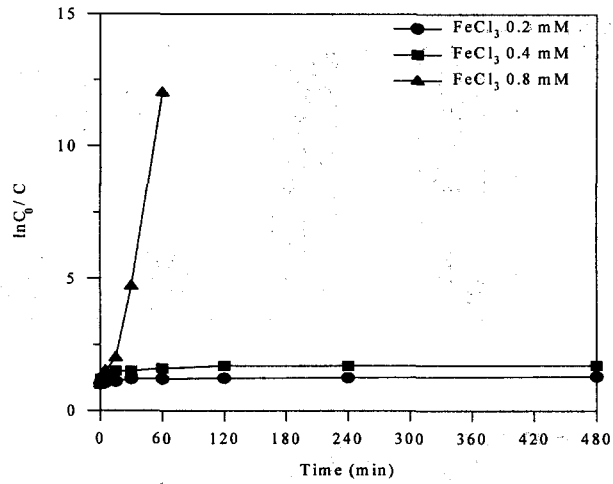


Fig. 3-4. Effect of various ferric ion concentrations on degradation of paraquat under dark condition.

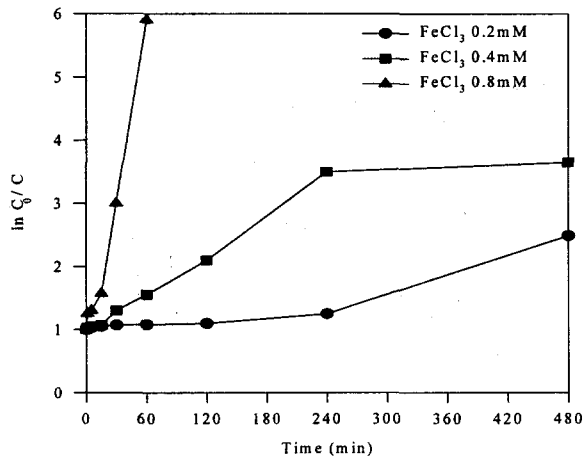


Fig. 3-5. Effect of various ferric ion concentrations on degradation of paraquat under UV irradiation.

Table 3-10. Degradation of paraquat in the aqueous solution by fenton's reagent under various conditions

Reaction time (hrs)	Paraquat conc. ($\mu\text{g/g}$)	Condition	Degraded rate(%)
24	10	No reagents/dark	-
		Fe^{3+} only/dark	0
		$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /dark	58
		No reagents/UV	0
		Fe^{3+} only/UV	0
		$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /UV	95
	100	No reagents/dark	-
		Fe^{3+} only/dark	0
		$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /dark	51
		No reagents/UV	0
		Fe^{3+} only/UV	0
		$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /UV	90
	200	No reagents/dark	-
		Fe^{3+} only/dark	0
		$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /dark	69
		No reagents/UV	0
		Fe^{3+} only/UV	0
		$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /UV	79
500	No reagents/dark	-	
	Fe^{3+} only/dark	0	
	$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /dark	1	
	No reagents/UV	0	
	Fe^{3+} only/UV	0	
	$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /UV	60	

Table 3-11. Rate data for paraquat in the aqueous solution by fenton's reagent with reaction times

Conditions	FeCl ₃ conc. (mM)	Mannitol conc. (M)	t _{1/2} , min	k, min ⁻¹
Fe ³⁺ /H ₂ O ₂ (dark)	0.2	0	3850	0.00018
	0.4		470	0.00148
	0.8		20	0.03135
Fe ³⁺ /H ₂ O ₂ (UV)	0.2	0	3300	0.00229
	0.4		300	0.00230
	0.8		20	0.03805
Fe ³⁺ /H ₂ O ₂ /mannitol (dark)	0.2	0.02	17300	0.00004
	0.4		2000	0.00035
	0.8		300	0.00277
	0.2	0.2	16000	0.00004
	0.4		6900	0.00010
	0.8		680	0.00102

사. 수용액 내에서 TiO₂에 의한 분해

TiO₂는 UV가 조사되는 반응 조건에서 빛에너지를 흡수하여 여기상태가 되고 결국 전자를 방출하여 결국 H₂O를 HO·와 H⁺로 산화시키고 fenton 반응과 마찬가지로 여기서 발생한 hydroxyl radical이 화합물의 분해를 촉진시킨다고 알려져 있다 (Haarstick 등, 1996; Torimoto 등, 1996; Kesselman, 1997). 0.1 ppm의 paraquat을 24 시간 동안 여러 가지 반응 조건에서 반응시킨 결과, 암조건에서 500 ppm의 TiO₂를 처리한 경우에는 13%가 분해되었고, UV에 의해 hydroxyl radical을 발생시킬 수 있어서 반응을 더욱 촉진시킬 가능성이 있는 0.035 M의 H₂O₂를 TiO₂와 함께 반응시킨 경우는 8%가 전환되었다. 따라서 H₂O₂는 TiO₂에 의한 산화 반응에 거의 영향을 끼치지 않음을 알 수 있다. UV를 조사하는 반응 조건에서 TiO₂만을 처리했을 경우는 82%, H₂O₂만 처리했을 경우는 9%, TiO₂와 H₂O₂를 함께 반응시킨 결과 90%가 분해

되었다 (표 3-12).

수용액 상태에서 여러 가지 광촉매제를 처리한 paraquat의 분해 양상은 토양 환경에 존재하는 paraquat의 처리를 기대할 수 있게 한다. 실제로 토양 구성물질에 흡착된 paraquat은 285 nm이상의 UV파장을 그 이하의 파장보다 많이 흡수하는 것으로 알려져 있으므로 paraquat으로 오염된 토양을 UV와 광촉매를 이용해서 신속하게 정화할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3-12. Degradation of paraquat in the aqueous solution by TiO₂ under various conditions

Reaction time (hrs)	Paraquat conc. (μg/g)	TiO ₂ conc. (μg/g)	conditions	Degraded rate (%)
24	0.1	500	TiO ₂ (dark)	13
			TiO ₂ /H ₂ O ₂ (dark)	8
			TiO ₂ (UV)	82
			H ₂ O ₂ (UV)	9
			TiO ₂ /H ₂ O ₂ (UV)	90

제3절 paraquat의 탈착양상

1. 서론

Paraquat으로 인해 발생할 수 있는 토양환경 관련 문제들에 대한 대처방안을 모색하기 위하여 paraquat 흡착 양상에서 규명된 내용을 토대로 paraquat이 강하게 흡착되어 있는 토양에서 paraquat이 탈착되어 환경오염을 유발할 우려가 있는지를 여러 가지 조건에서 보다 구체적으로 밝히고 또한 흡착되어 있는 paraquat을 효과적으로 제거시킬 수 있는 방법에 대하여 연구하였다.

2. 재료 및 방법

가. Paraquat의 토양 중 분해 반감기

Paraquat의 토양 중 분해 반감기를 확인하기 위하여 과수원 토양을 선정하여 실내 시험 조건에서는 2.5 ppm과 5.0 ppm 수준으로, 포장시험 조건에서는 0.15 kg a.i./10 a와 0.29 kg a.i./10 a 수준으로 paraquat을 살포하여 시간이 경과함에 따라 paraquat이 어느 정도 분해되는지를 조사하여 paraquat의 반감기를 조사하였다. 과수원 토양의 물리·화학적 성질은 표 3-13과 같다. 과수원 토양 25 g에 65 ml의 H₂O, 35 ml의 18N-H₂SO₄와 Octan-2-ol 1 ml를 가하고 5시간동안 환류추출한 후, 추출액을 glass-fiber filter를 통하여 흡인여과하였으며, 여과액을 증류수를 사용하여 1 l로 희석한 후 양이온교환수지 (Dowex 50W-X8, H type, 100-200 mesh)를 사용하여 정제하였다. 양이온교환수지는 NaOH 포화용액과 H₂O를 이용하여 pre-conditioning하여 시료액을 양이온교환수지에 통과시킨 다음 50 ml의 H₂O, 25 ml의 2N-HCl, 25 ml의 H₂O, 100 ml의 2.5%-NH₄Cl, 25 ml의 H₂O를 차례로 통과시켜 세척한 후 양이온교환

수지에 흡착된 불순물들을 제거하고 최종적으로 50 ml의 NH₄Cl, 포화용액으로 paraquat을 용출시켰다. 용출액 50 ml중 10 ml을 취하여 환원발색시약 (sodium hydrosulfite)으로 환원시켜 생성된 남색의 free radical을 분광광도계 (Shimadzu Model 160A UV/VIS spectrophotometer)로 정량하였다.

Table 3-13. Physico-chemical properties of orchard soil

Soil	Texture	Particle size Dist. (%)			pH (soil:water, w/v)	O. M. (%)	CEC (cmol/kg)
		Clay	Silt	Sand			
Orchard soil	Loam	11.5	42.7	45.8	6.5	1.9	8.0

나. 토양에 흡착된 paraquat의 물에 의한 탈착 실험

토양에 흡착된 paraquat이 물에 의해 탈착될 가능성이 있는지를 조사하기 위하여 paraquat이 10 ppm 수준으로 흡착된 토양 25 g에 물을 첨가하여 5시간동안 진탕추출 혹은 환류추출한 다음 탈착되어지는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

다. 토양에 흡착된 paraquat의 탈착에 대한 pH의 영향

pH 변화가 토양에 흡착된 paraquat의 탈착에 미치는 영향을 조사하기 위하여 paraquat이 10 ppm 수준으로 흡착된 토양 10 g에 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0으로 조절된 Clack와 Lubs buffer 용액 100 ml을 첨가하여 48시간 왕복진탕한 후 원심분리하여 얻어진 상등액을 0.45 μm nylon filter로 여과한 후 여액의 paraquat 잔류량을 HPLC로 분석하여 탈착된 paraquat의 양을 정량하였다.

라. 토양에 흡착된 paraquat의 탈착에 대한 계면활성제의 영향

토양에 흡착된 paraquat이 계면활성제에 의해 탈착될 가능성이 있는지를 조사하기 위하여 paraquat이 10 ppm 수준으로 흡착된 토양 25 g에 비이온성 계면활성제의 일종인 Triton X-100 (Junsei Chemical Co., Ltd.)과 음이온성 계면활성제의 일종인 Sodium dodecylbenzenesulfonate (Junsei Chemical Co., Ltd.)를 첨가하여 5시간동안 왕복진탕한 후 원심분리하여 얻어진 상등액을 0.45 μ m nylon filter를 이용하여 여과한 후 여액을 HPLC로 paraquat의 잔류량을 분석하였다.

마. 전기영동에 의한 토양에 흡착된 paraquat의 탈착 실험

토양에 흡착된 paraquat의 전기적인 탈착 가능성을 조사하기 위하여 500 ppm과 2,757 ppm의 paraquat 용액 1.0 ml을 토양 1.0 g에 첨가한 후 이 토양시료를 사용하여 Native polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다. Separating gel은 15% T 5% C_{bis} polyacrylamide gel을 사용하였으며, tank buffer로는 0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M glycine을 사용하였다. 100 mA, 180 V에서 30분 동안 전기영동한 후 0.3 M NaOH 25 ml에 sodium hydrosulfite를 0.0588 g 녹인 환원발색시약을 separating gel 표면에 부어 발색여부를 관찰하여 paraquat의 탈착여부를 조사하였다. 대조구로는 500 ppm의 paraquat 용액을 사용하였다.

바. Incineration에 따른 토양 중 paraquat의 소실 실험

Incineration 온도에 따른 토양 중 paraquat의 소실양상을 조사하기 위하여 paraquat이 10 ppm 수준으로 흡착된 토양 25 g을 200°C, 300°C, 400°C 그리고 550°C의 회화로 (Leaton thermal designs limited, Ultraspeed)에서 incineration시켜 각각의

온도에서 시간에 따라 분해된 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

연소제의 첨가에 따른 토양 중 paraquat의 분해에 미치는 incineration의 영향을 조사하기 위하여 paraquat이 10 ppm 수준으로 흡착된 토양 25 g에 연소제로서 ethanol과 벧짚을 일정량 첨가하여 direct incineration시킨 후 paraquat의 분해율을 조사하였다. Ethanol은 토양무게당 0.4~10배에 해당하는 부피를 토양에 첨가하였으며, 벧짚은 토양무게당 1~10배에 해당하는 양을 첨가하여 도가니 안에서 토양과 함께 direct incineration시킨 후 환류추출과 양이온교환과정을 거쳐 분광광도계로 토양 중 paraquat의 잔류량을 조사하였다.

사. α -Cyclodextrin에 의한 토양 중 paraquat의 분해 실험

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 α -cyclodextrin의 영향을 조사하기 위하여 paraquat이 흡착된 담수 토양 및 비담수 토양 25 g에 10% α -cyclodextrin solution을 1.0 ml 첨가하여 28°C에서 3일간 incubation시킨 후 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

α -Cyclodextrin solution의 첨가량 변화에 따른 토양 중 paraquat의 분해양상을 조사하기 위하여 10% α -cyclodextrin solution을 0.2, 1.0, 3.0 ml 첨가하여 28°C에서 3일간 incubation시킨 후 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

아. Sulfur에 의한 토양 중 paraquat의 분해 실험

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 sulfur의 영향을 조사하기 위하여 paraquat이 흡착된 담수 토양 및 비담수 토양 25 g에 sulfur를 1.0 g씩 첨가하여 28°C에서 3일간 incubation시킨 후 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

Sulfur의 첨가량 변화에 따른 토양 중 paraquat의 분해양상을 조사하기 위하여 sulfur powder를 0.2, 1.0, 3.0 g 첨가하여 28°C에서 3일간 incubation시킨 후 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

자. 미생물에 의한 paraquat의 분해 실험

미생물에 의한 paraquat의 분해 양상을 조사하기 위하여 pH 6.8의 MCY 배지에 paraquat을 10 ppm과 50 ppm 수준으로 처리한 다음 토착 미생물인 *O. anthropi*와 paraquat 내성유전자를 포함하는 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*를 접종하여 28°C에서 약 6일간 배양시킨 다음 일정시간별로 각 미생물의 생육 정도와 paraquat의 분해 양상을 조사하였다.

실험에 사용된 MCY 배지의 조성은 증류수 1.0 l 당 D-glucose 10 g, KH_2PO_4 310 mg, KCl 23 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 mg, Na-EDTA 560 μg , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 9.8 μg , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 69 μg , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 436 μg , D-biotin 0.2 μg , yeast extract 0.1 g으로 구성되어 있다.

미생물 균주로는 토양추출물로부터 paraquat에 대해 내성을 가지는 세균을 선발하여 *O. anthropi* JW-2라고 명명한 것과 *O. anthropi* JW-2의 genomic DNA library로부터 선발한 paraquat 내성유전자를 포함하는 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*를 실험에 사용하였다. *O. anthropi* 및 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*는 LB 배지에서 충분히 계대배양한 다음 inoculum으로 사용하였으며 paraquat이 처리되지 않은 구를 대조구로 사용하였다. 일정 배양시간별로 3 ml씩 배양액을 채취하여 각 미생물의 생육 정도와 paraquat의 잔류량 측정에 사용하였으며, 미생물의 생육 정도와 MCY 배지 중 paraquat의 잔류량은 각각 분광광도계 (660 nm)와 HPLC를 사용하여 분석하였다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. Paraquat의 토양 중 분해 반감기

1) 포장시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기

포장시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기는 표 3-14와 같으며, 0.15 kg a.i./10 a 수준으로 처리한 구에서는 203일, 0.29 kg a.i./10 a 수준으로 처리한 구에서는 330일로 나타났다.

Table 3-14. Half life and residual concentration of paraquat in orchard soil under field conditions

Application concentration (mg/kg)	Elapsed days after application	Residual concentration (mg/kg)	Half life** (day)
0.15kg a.i./10a	0	2.5	203 $R=2.4508e^{-0.0034t}$ ($r=-0.9733^*$)
	30	2.4	
	60	2.3	
	90	1.7	
	120	1.4	
	180	1.2	
	240	1.0	
	300	0.9	
	360	0.8	
0.29kg a.i./10a	0	4.3	330 $R=3.8340e^{-0.0021t}$ ($r=-0.9518^*$)
	30	3.7	
	60	3.5	
	90	3.1	
	120	2.6	
	180	2.4	
	240	2.2	
	300	2.1	
	360	2.0	

* Significant at 1% probability level

** Half life is by theoretical equation ($R=A \cdot e^{-Bt}$)

2) 실내시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기

실내시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기는 표 3-15와 같으며, 2.5 mg/kg이 처리된 구에서는 231일, 5.0 mg/kg이 처리된 구에서는 433일로 나타났다.

Table 3-15. Half life and residual concentration of paraquat in orchard soil under laboratory condition

Application concentration (mg/kg)	Elapsed days after application	Residual concentration (mg/kg)	Half life** (day)
2.5	0	2.5	231 $R=2.2605e^{-0.0030t}$ ($r=-0.9556^*$)
	30	2.1	
	60	2.0	
	90	1.8	
	120	1.3	
	180	1.2	
	240	1.0	
	300	1.1	
	360	0.8	
5.0	0	4.3	433 $R=3.8632e^{-0.0016t}$ ($r=-0.9401^*$)
	30	3.9	
	60	3.4	
	90	3.2	
	120	2.9	
	180	2.7	
	240	2.4	
	300	2.5	
	360	2.3	

* Significant at 1% probability level

** Half life is by theoretical equation ($R=A \cdot e^{-Bt}$)

나. 토양에 흡착된 paraquat의 물에 의한 탈착

토양에 흡착된 paraquat의 물에 의한 탈착 가능성을 조사한 결과는 표 3-16과 같

다. 물에 의한 진탕추출 및 환류추출은 토양으로부터의 paraquat 탈착에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 이는 토양과 강하게 결합되어 있는 paraquat이 강우에 의해 탈착되어 이동되어질 가능성이 없음을 시사한다.

Table 3-16. Desorption of paraquat from soil by shaking with water and soxhlet extraction

Conc. of paraquat (mg/kg)	Desorption ratio of paraquat (%)	
	Shaking with water	Soxhlet extraction
10	0	0

다. 토양에 흡착된 paraquat의 탈착에 대한 pH의 영향

토양에 흡착된 paraquat의 탈착에 미치는 desorption solution의 pH 영향을 조사한 결과는 표 3-17과 같다. pH 3.0~6.0으로 조제된 desorption solution에 의한 paraquat의 탈착은 사용되어진 pH 범위에 관계없이 이루어지지 않았다. 이로써 토양에 흡착된 paraquat은 pH 5.6이하의 산성비에 의해 탈착될 가능성은 없는 것으로 사료된다.

Table 3-17. Desorption of paraquat from soil by different pH of desorption solution

Conc. of paraquat (mg/kg)	Desorption ratio of paraquat (%)			
	pH range of desorption solution			
	3.0	4.0	5.0	6.0
10	0	0	0	0

라. 토양에 흡착된 paraquat의 탈착에 대한 계면활성제의 영향

토양에 흡착된 paraquat의 탈착에 미치는 계면활성제의 영향을 조사한 결과는 표 3-18과 같다. 계면활성제의 종류에 관계없이 그리고 첨가된 각각의 계면활성제의 농도에 관계없이 토양에 흡착된 paraquat의 탈착에는 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 나타났다. Paraquat이 흡착된 토양으로부터 paraquat을 탈착시키기 위한 방안으로 계면활성제의 사용 가능성을 검토해 본 결과 계면활성제의 첨가에 따른 토양 중 paraquat의 탈착은 이루어지지 않을 것으로 사료된다.

Table 3-18. Effect of surfactant on paraquat desorption from soil

Conc. of paraquat (mg/kg)	Desorption ratio of paraquat (%)							
	Nonionic surfactant (Triton X-100, ppm)				Anionic surfactant (Sodium dedocylbenzosulfonate, ppm)			
	77.5	155	310	610	77.5	155	310	610
10	0	0	0	0	0	0	0	0

마. 전기영동에 의한 토양에 흡착된 paraquat의 탈착

Native polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 paraquat이 500 mg/kg과 2,757 mg/kg 수준으로 처리된 토양을 separating gel상에 loading하여 30분간 전기영동 시킨 결과 paraquat이 흡착된 토양이 loading된 separating gel상에서는 발색시약에 의한 발색이 이루어지지 않았으며, 500 ppm의 paraquat solution이 loading된 separating gel 상에서는 청색의 발색이 이루어져 가시적 band가 형성되었다. 이는 paraquat이 토양과 강하게 흡착된 형태로 존재할 경우에는 전기영동에 의해 토양으로

부터 paraquat의 탈착이 이루어지지 않음을 시사하며 paraquat이 2가의 양이온 형태로 유리되어 존재하는 solution상태의 경우에는 전기영동에 의해 paraquat이 (-)극으로 이동되어질 수 있기 때문인 것으로 사료된다.

바. Incineration에 따른 토양 중 paraquat의 소실

1) Incineration 온도의 영향

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 incineration 온도의 영향을 조사한 결과 200℃에서는 paraquat이 흡착된 토양을 8시간 incineration시켰을 때부터 paraquat의 분해효과가 서서히 나타나기 시작하여 12시간까지 incineration시켰을 경우 약 10%의 분해율을 나타내었다. 300℃에서는 incineration time이 증가되어질 수록 paraquat의 분해율이 점차 증가되어 8시간 이상 incineration시켰을 경우 87%이상의 paraquat 분해율을 나타내었다. 400℃와 550℃에서는 최소 2시간 이상의 incineration time으로 99%이상의 paraquat 분해율을 나타내었다. 따라서 토양에 흡착된 paraquat을 효과적으로 분해시키기 위해서는 400℃이상의 incineration 온도에서 최소 2시간 이상의 incineration time이 요구되어지는 것으로 나타났다.

2) 연소제의 첨가에 따른 direct incineration

연소제의 첨가에 따른 direct incineration을 통한 토양 중 paraquat의 분해양상을 조사한 결과는 표 3-19와 같다. Ethanol을 연소제로 첨가하여 paraquat이 흡착된 토양을 direct incineration시킨 처리구의 경우 첨가량에 관계없이 paraquat의 분해는 이루어지지 않았으며, 벧짚을 연소제로 첨가하여 direct incineration시킨 처리구의 경우도 첨가량에 관계없이 paraquat의 분해는 이루어지지 않았다. 따라서, 토양 중에 흡착

되어 있는 paraquat는 볏짚이나 건초 등을 토양 위에서 연소시켜도 분해되지 않을 것으로 예측된다.

Table 3-19. Effect of ignition materials on paraquat degradation from soil incineration

Conc. of paraquat (mg/kg)	Degradation ratio of paraquat (%)					
	Species of ignition material					
	Addition of ethanol (ml)			Addition of straw (g)		
	10	25	250	25	100	250
10	0	0	0	0	0	0

사. α -Cyclodextrin에 의한 토양 중 paraquat의 분해

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 α -cyclodextrin의 영향을 조사한 결과는 표 3-20과 같다. 10% α -cyclodextrin solution 1.0 ml을 담수 토양에 첨가한 처리구의 경우 30.0%, 비담수 토양에 첨가한 처리구의 경우 71.0%의 paraquat 분해율을 나타내어 담수 토양보다는 비담수 토양에서 paraquat의 분해효과가 약 40%정도 더 높게 나타났다. 따라서, 토양 중 paraquat의 분해를 위한 10% α -cyclodextrin solution의 처리는 담수 토양보다는 비담수 토양에서 효과적임을 알 수 있다.

10% α -Cyclodextrin solution의 첨가농도 변화가 토양중 paraquat의 분해에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 3-21과 같다. Paraquat이 흡착된 비담수 토양에 10% α -cyclodextrin solution을 0.2, 1.0, 3.0 ml 첨가한 처리구의 경우 paraquat의 분해율은 각각 16.0, 69.3, 73.1%로 나타나 첨가농도가 증가됨에 따라 paraquat의 분해율도 증가되는 경향을 보였다.

Table 3-20. Effect of α -cyclodextrin on paraquat degradation under different soil condition

Conc. of paraquat (mg/kg)	Degradation ratio of paraquat (%)	
	Addition of 10% α -cyclodextrin (1.0 ml)	
	Flooded soil	Upland soil
10	30.0	71.0

Table 3-21. Degradation of paraquat by different addition of α -cyclodextrin on paraquat degradation under upland soil condition

Conc. of paraquat (mg/kg)	Degradation ratio of paraquat (%)		
	Addition of 10% α -cyclodextrin (ml)		
	0.2	1.0	3.0
10	16.0	69.3	73.1

아. Sulfur에 의한 토양 중 paraquat의 분해

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 sulfur의 영향을 조사한 결과는 표 3-22와 같다. Sulfur powder를 담수 토양에 첨가한 처리구의 경우 80.2%, 비담수 토양에 첨가한 처리구의 경우 45.6%의 paraquat 분해율을 나타내어 비담수 토양보다는 담수 토양에서 paraquat의 분해효과가 약 43.4%정도 더 높게 나타났다. 따라서 토양 중 paraquat의 분해를 위한 sulfur의 처리는 비담수 토양보다는 담수 토양에서 효과적임을 알 수 있다.

Table 3-22. Effect of sulfur on paraquat degradation under different soil condition.

Conc. of paraquat (mg/kg)	Degradation ratio of paraquat (%)	
	Addition of sulfur powder (1.0 g)	
	Flooded soil	Upland soil
10	80.2	45.6

Sulfur powder의 첨가농도 변화가 토양 중 paraquat의 분해에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 3-23과 같다. Paraquat이 흡착된 담수 토양에 sulfur powder를 0.2, 1.0, 3.0 g 첨가한 처리구의 경우 paraquat의 분해율은 각각 28.6, 77.8, 93.6%로 나타나 첨가농도가 증가됨에 따라 paraquat의 분해율도 증가되는 경향을 보였다.

Table 3-23. Degradation of paraquat by different addition of sulfur powder on paraquat degradation under upland soil condition.

Conc. of paraquat (mg/kg)	Degradation ratio of paraquat (%)		
	Addition of sulfur powder (g)		
	0.2	1.0	3.0
10	28.6	77.8	93.6

자. 미생물에 의한 paraquat의 분해

미생물에 의한 paraquat의 분해 양상을 조사한 결과는 10 mg/kg의 paraquat이 처리된 구의 경우 그림 3-6 및 3-7, 50 mg/kg의 paraquat이 처리된 구의 경우는 그림 3-8 및 3-9와 같았다.

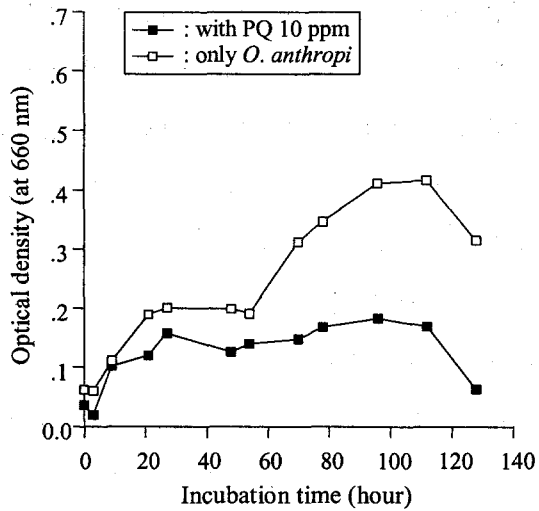


Fig. 3-6. Cell growth of indigenous microorganism (*O. anthropi*) in the MCY medium with paraquat 10 ppm.

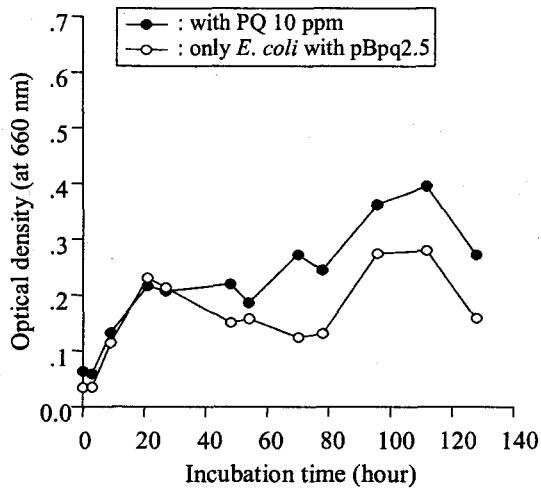


Fig. 3-7. Cell growth of *E. coli* with pBpq2.5 in the MCY medium with paraquat 10 ppm.

10 ppm의 paraquat이 처리된 MCY 배지에서 토양미생물인 *O. anthropi*를 접종한 경우 paraquat이 처리된 구가 처리되지 않은 구보다 생육 정도가 낮게 나타나 paraquat이 균 생육을 억제시키는 것으로 나타났다. 또한 paraquat이 처리되지 않은 구의 경우 배양 60시간까지 서서히 균 생육이 증가하다가 60~120시간에 걸쳐 균 생육이 가장 활발하였으며 그 이후에는 감소하였다. 그러나 paraquat이 처리된 구의 경우는 30시간까지 균 생육이 서서히 증가하여 30~120시간에 걸쳐 별다른 변화없는 생육정도를 유지하다가 배양 120시간 이후에는 생육정도가 감소하였다 (Fig. 3-6).

10 ppm의 paraquat이 처리된 MCY 배지에서 paraquat 내성유전자를 포함하는 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*를 접종한 경우 paraquat이 처리된 구가 처리되지 않은 구보다 생육 정도가 높게 나타났다. Paraquat이 처리되지 않은 구의 경우 배양 20시간까지 균 생육이 서서히 증가하다가 20~80시간에 걸쳐 별다른 변화없이 생육정도를 유지하다가 80~120시간에 균 생육이 가장 활발하였으며 그 이후에는 감소하였다. 또한 paraquat이 처리된 구의 경우도 유사한 경향을 나타내었다 (Fig. 3-7).

10 ppm의 paraquat이 처리된 MCY 배지에서 균주 *O. anthropi*와 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*를 접종한 경우 두 균주 모두 생육정도의 차이는 크게 나타나지 않았다. 이는 처리된 paraquat의 농도인 10 ppm이 본 연구에 사용한 균주의 생육에 크게 영향을 미치지 않는 것 때문인 것으로 사료된다.

50 ppm의 paraquat이 처리된 MCY 배지에서 균주 *O. anthropi*를 접종한 경우 paraquat이 처리된 구와 처리되지 않은 구의 생육 정도가 유사하게 나타났으며 10 ppm의 paraquat이 처리된 경우보다는 약간의 생육 증가를 나타내었다. Paraquat이 처리되지 않은 구의 생육 정도는 배양 35시간까지 서서히 균 생육 증가를 보이다가 35시간 이후에는 생육정도의 증감은 약간 있었으나 큰 변화없이 그대로 유지되었다. Paraquat이 처리된 구의 경우도 배양 35시간까지 균 생육이 서서히 증가하여 35시간 이후에는 별다른 생육 정도의 변화없이 그대로 유지되었다 (Fig. 3-8).

50 ppm의 paraquat이 처리된 MCY 배지에서 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*를 접종한 경우 paraquat이 처리된 구가 처리되지 않은 구보다 생육 정도가 오히려 낮게 나타났다. Paraquat이 처리되지 않은 구의 경우 배양 18시간까지 생육 정도가 급격히 증가하여 배양 30시간까지 최대의 생육을 나타내었으나 그 이후에는 지속적인 감소를 나타내었다. 그러나 paraquat이 처리된 구의 경우는 배양 18시간까지 생육 정도가 급격히 증가하긴 하였으나 paraquat을 처리하지 않은 처리구보다는 생육 정도가 낮았으며 그 이후에는 별다른 생육 정도의 변화없이 그대로 유지되었다 (Fig. 3-9).

50 ppm의 paraquat이 처리된 MCY 배지에서 균주 *O. anthropi*와 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*를 접종한 경우 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 오히려 생육이 활발하였는데 이는 paraquat 내성유전자를 가지고 있는 것으로 알려진 pBpq2.5가 오랜기간 동안의 계대배양을 통하여 paraquat에 대해 내성기작을 나타내는 유전자의 활성을 잃어버렸기 때문인 것으로 사료된다.

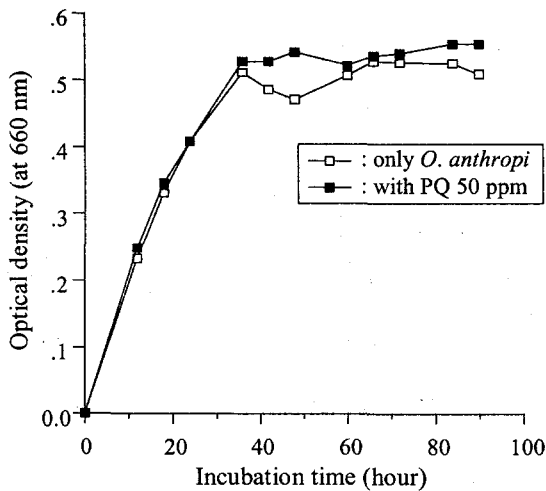


Fig. 3-8. Cell growth of indigenous microorganism (*O. anthropi*) in the MCY medium with paraquat 50 ppm.

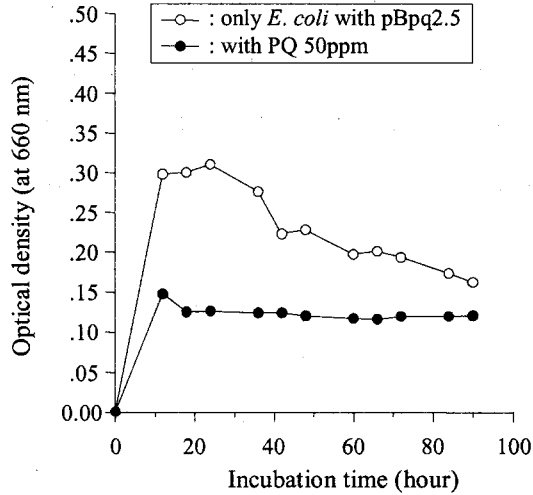


Fig. 3-9. Cell growth of paraquat resistant strain (pBpq2.5) in the MCY medium with paraquat 50 ppm.

10 ppm과 50 ppm의 paraquat이 처리된 MCY 배지에서 토착미생물인 *O. anthropi*와 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*에 의한 paraquat의 분해 양상을 조사한 결과 표 3-24와 같다.

10 ppm의 paraquat이 처리된 구의 경우 최종 배양기간에 걸쳐 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*가 6.5%, *O. anthropi*가 29.4%의 paraquat를 분해하는 것으로 나타났다. 10 ppm의 paraquat이 처리된 구에서 두 균주의 생육 정도의 차이가 크지 않았다는 것을 고려할 때 10 ppm의 paraquat을 분해시킬 수 있는 능력이 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 더 크다는 것을 알 수 있다.

50 ppm의 paraquat이 처리된 구의 경우 최종 배양기간에 걸쳐 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*가 14.3%, *O. anthropi*가 22.1%의 paraquat을 분해하는 것으로 나타났다. 50 ppm의 paraquat이 처리된 구에서 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O.*

*anthropi*가 생육 정도가 1.7배 높게 나타나 50 ppm의 paraquat을 분해시킬 수 있는 능력 및 생육 정도가 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 더 크다는 것을 알 수 있었다.

Table 3-24. Degradation of paraquat (10 ppm and 50 ppm) by indigenous microorganism (*O. anthropi*) and paraquat resistant strain (pBpq2.5)

Conc. of paraquat (mg/kg)	Incubation time (hour)	Degradation ratio of paraquat (%)	
		Species of inoculum	
		<i>O. anthropi</i>	pBpq2.5
10	21	15.9	1.1
	48	22.0	2.8
	70	25.4	3.8
	96	27.3	4.7
	128	29.4	6.5
50	6	1.9	1.2
	24	7.2	1.9
	48	11.1	1.9
	72	12.1	7.9
	98	20.0	14.0
	114	22.1	14.3

제4절 Paraquat의 식물체로의 이행

1. 서론

α -Cyclodextrin에 의한 토양 중 paraquat의 제거 가능성을 바탕으로 흡착된 paraquat의 식물체로의 이행 가능성을 SAC-WB (strong adsorption capacity measured using wheat bioassay) 조사를 통하여 규명하고자 하였다.

SAC-WB 조사란 토양 내 paraquat을 평형농도 (equilibrium solution)에 도달하도록 처리시 paraquat이 토양 내 강력하게 흡착하는 paraquat의 농도를 SAC (strong adsorption capacity)이라 정의하며, 이 때 평형에 도달한 농도에서 14일령의 밀의 뿌리에 대하여 paraquat 무처리구와 비교시 50%의 뿌리저하를 나타낸 농도를 구하는 생물 검정을 실시하는 것을 말한다.

2. 재료 및 방법

가. SAC-WB 조사를 통한 paraquat의 식물체 이행

1) SAC-WB 조사

먼저 실험에 사용된 토양의 SAC-WB 값을 구하기 위하여 paraquat을 농도별 (0, 180, 200, 220, 240, 260, 280 mg/kg)로 처리하여 밀에 대한 paraquat의 SAC-WB 값을 확인하고 또한 최소 저해농도를 확인하기 위하여 paraquat을 농도별 (0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/kg)로 처리하여 SAC-WB 값 조사도 실시하였다.

2) 식물체의 종류에 따른 영향

α -Cyclodextrin에 의한 paraquat의 보리와 밀에 대한 영향을 확인하기 위하여 SAC-WB 조사를 실시하였다. paraquat이 흡착된 토양 10 g에 10% α -cyclodextrin solution을 1.0 ml 첨가하고 이를 H₂O로 200 ml되게 첨가하여 300 rpm에서 16시간 동안 진탕하고 4,000 g에서 12분간 centrifuge하였다. 이 상등액을 포트에 담고 0.1 g의 CaCO₃를 넣은 후 5분간 초음파 추출하였다. 한편 보리와 밀은 8시간 침종하고 상온(28℃)에서 약 30시간 동안 흡습지 위에서 뿌리 길이가 5 mm정도 자라도록 최아시킨 다음 최아 종자 6개를 포트의 나일론 거즈에 올려놓고 암상태, 다습조건에서 12시간 동안 뿌리가 용액쪽으로 자라게 한다. 그 후 16시간 일장의 생장점(최고기온 28~32℃, 최저기온 18~22℃)에서 증류수로 보충하며 14일간 생육시킨 후 보리와 밀의 최장 근장을 측정하여 생육정도를 확인하였다.

3) α -Cyclodextrin 첨가량 변화에 따른 영향

α -Cyclodextrin solution의 첨가량 변화에 따른 작물(밀) 생육의 영향을 관찰하기 위하여 10% α -cyclodextrin solution의 첨가량을 1.0 ml 및 3.0 ml로 변화시켜 동일한 방법으로 SAC-WB 조사를 실시하였다.

나. 흡착된 paraquat의 α -cyclodextrin에 의한 제거

1) 점토광물에 흡착된 paraquat의 유출 여부 실험

Paraquat이 흡착되어 있는 점토광물에 직접 α -cyclodextrin을 처리하여 paraquat의 유출 여부를 조사하기 위하여 점토광물 montmorillonite, kaolinite에 paraquat을 농

도별로 처리하고 각각 10% α -cyclodextrin solution을 1.0 ml 첨가한 후 28°C에서 2일간 incubation한 후 HPLC로 정량분석하였다.

2) Paraquat의 제거에 대한 incubation time의 영향

α -Cyclodextrin 첨가에 의한 paraquat의 제거에 영향을 미치는 incubation time의 영향을 확인하기 위하여 paraquat이 흡착된 토양 25 g에 10% α -cyclodextrin solution을 1.0 ml 첨가하여 incubation time을 2, 15, 30일로 변화시켜 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

3) Paraquat의 제거에 대한 incubation temperature의 영향

α -Cyclodextrin 첨가에 의한 paraquat의 제거에 영향을 미치는 incubation temperature의 영향을 확인하기 위하여 paraquat이 흡착된 토양 25 g에 10% α -cyclodextrin solution을 1.0 ml 첨가하여 incubation temperature를 4, 28, 56°C로 변화시켜 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

4) Dehydrogenase 활성에 미치는 영향

α -Cyclodextrin 첨가에 의한 paraquat의 제거에서 미생물의 영향을 간접적으로 확인하기 위하여 paraquat이 흡착된 토양 25 g에 10% α -cyclodextrin solution을 1.0 ml 첨가하여 28°C에서 2일간 incubation하고 이 토양을 시간별로 2 g씩 취하여 triphenyltetrazolium chloride 용액 2 ml을 첨가하고 30°C에서 24시간 incubation한 후 centrifuge하여 564 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit의 dehydrogenase의 활성도는 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride로부터 2,3,5-triphenyltetrazolium formazan을 생

성시켜 564 nm에서 흡광도를 0.1만큼 증가시키는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

5) Glucose 첨가의 영향

α -Cyclodextrin 첨가에 의한 paraquat의 제거에서 미생물의 영향을 간접적으로 확인하기 위한 또 하나의 방법으로 D-glucose를 첨가하여 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 확인하였다. paraquat이 흡착된 토양 25 g에 10% α -cyclodextrin solution을 1.0 ml 첨가한 후 10% D-glucose 1.0 ml을 단독, 혼합 처리하여 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다. 또한 D-glucose를 첨가하게 되면 potential dehydrogenase 활성까지 측정할 수 있으므로 이 토양을 시간별로 2 g씩 취하여 dehydrogenase 활성을 측정하였다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. SAC-WB 조사를 통한 paraquat의 식물체 이행

1) SAC-WB 조사

실험에 사용된 토양의 SAC-WB 값을 조사한 결과는 표 3-25와 같다. Paraquat을 처리하지 않은 무처리와 비교시 50%의 뿌리 저하를 나타내는 농도는 240 mg/kg으로 나타나 실험에 사용된 토양의 SAC-WB 값은 약 240 mg/kg이었다.

실험에 사용된 토양에서 paraquat이 식물체 뿌리의 성장에 미치는 최소 저해농도를 확인한 결과는 표 3-26과 같다. 저해 수준을 무처리구와 비교시 식물체 뿌리의 길이가 10% 감소한 것으로 보았을 때 그 저해 농도는 약 30 mg/kg인 것으로 나타났다.

Table 3-25. SAC-WB of paraquat

Length of wheat root (cm) *						
Concentration of paraquat (mg/kg)						
0	180	200	220	240	260	280
15.1±2.0	9.5±1.3	9.6±1.8	8.4±2.0	7.3±1.7	6.3±0.9	5.8±1.0

* mean of six replication of longest root

Table 3-26. Effect of paraquat on the growth of wheat root at low concentration level

Length of wheat root (cm) *					
Concentration of paraquat (mg/kg)					
0	10	20	30	40	50
11.7±1.3	11.2±1.1	11.1±1.3	10.6±1.6	10.0±0.9	9.9±1.1

* mean of six replication of longest root

2) 식물체의 종류에 따른 영향

α -Cyclodextrin의 첨가에 의한 흡착된 paraquat의 보리 뿌리의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 3-27과 같다. 5 mg/kg 수준으로 처리된 paraquat의 농도에서는 보리 뿌리의 성장에 특이한 저해 현상이 나타나지 않았고 α -cyclodextrin 첨가에 의하더라도 보리 뿌리의 성장이 첨가하지 않은 구와 같게 나타나 흡착된 paraquat의 유출은 일어나지 않는 것으로 나타났다.

Table 3-27. Effect of α -cyclodextrin on the growth of barley root at 5 ppm concentration of paraquat

Concentration of paraquat (mg/kg)	Length of barley root (cm) *	
	10% α -cyclodextrin (1.0 ml)	
	No addition	Addition
5	15.2±0.9	15.1±0.8

* mean of six replication of longest root

α -Cyclodextrin에 의한 paraquat의 밀에 대한 영향을 조사한 결과는 표 3-28과 같다. 각기 다른 농도 (300 μ g/10 g, 3,000 μ g/10 g)의 paraquat이 흡착된 토양 10 g에 10% α -cyclodextrin solution을 1.0 ml 첨가한 결과 밀의 뿌리 생장은 300 μ g/10 g의 경우 1.5%의 감소하는 경향이 나타났으며 3,000 μ g/10 g의 경우 15.7%의 증가하는 경향이 나타났다. 저농도 및 고농도로 흡착된 paraquat은 α -cyclodextrin solution의 첨가에 의한 유출 현상이 일어나지 않아 밀 뿌리의 성장에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 밀 뿌리의 성장에는 영향을 주지 않는 것으로 나타나 식물체로의 이행은 이루어지지 않을 것으로 생각된다.

Table 3-28. Effect of α -cyclodextrin on the growth of wheat root under different concentration of paraquat

Concentration of paraquat (mg/kg)	Length of wheat root (cm) *	
	10% α -cyclodextrin (1.0 ml)	
	No addition	Addition
30	13.6±1.6	13.4±2.3
300	4.3±0.6	5.1±1.4

* mean of six replication of longest root

3) α -Cyclodextrin 첨가량 변화에 따른 영향

α -Cyclodextrin solution의 첨가량 변화에 따른 작물 생육의 영향을 조사한 결과는 표 3-29와 같다. 각기 다른 농도 (300 $\mu\text{g}/10\text{ g}$, 3,000 $\mu\text{g}/10\text{ g}$)의 paraquat이 흡착된 토양 10 g에 10% α -cyclodextrin solution을 1.0 ml, 3.0 ml 첨가한 결과 밀의 뿌리 생장은 300 $\mu\text{g}/10\text{ g}$ 의 경우 각각 1.5, 7.4%의 감소경향이 나타났으며, 3,000 $\mu\text{g}/10\text{ g}$ 의 경우 각각 18.6, 9.3%의 증가경향이 나타났다. 이는 저농도의 경우 α -cyclodextrin solution의 첨가량이 많을수록 paraquat이 소량 유출되기는 하나 고농도에서는 효과가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 밀 뿌리의 성장에는 영향을 주지 않는 것으로 나타나 식물체로의 이행은 이루어지지 않을 것으로 생각된다.

Table 3-29. Effect of addition amount of α -cyclodextrin on the growth of wheat root under different concentration of paraquat

Concentration of paraquat (mg/kg)	Length of wheat root (cm) *		
	Addition of 10% α -cyclodextrin (ml)		
	0.0	1.0	3.0
30	13.6 \pm 1.6	13.4 \pm 2.3	12.6 \pm 0.6
300	4.3 \pm 0.6	5.1 \pm 1.4	4.7 \pm 0.9

* mean of six replication of longest root

따라서, 이상의 SAC-WB 실험 결과를 요약하면 실험에 사용된 토양의 SAC-WB 값은 240 mg/kg으로 나타났다. 또한 토양에 흡착된 paraquat은 30 mg/kg 이내에서는 식물체로 거의 흡수되지 않아서 뿌리의 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. α -Cyclodextrin 첨가에 의한 paraquat의 유출 현상에 의한 밀 뿌리의 성장을 조사한

결과, 10% α -cyclodextrin 3.0 ml의 첨가에 의해서는 거의 유출되지 않아서 밀 뿌리의 성장에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

나. 흡착된 paraquat의 α -cyclodextrin에 의한 제거

1) 점토광물에 흡착된 paraquat의 유출 여부 실험

Paraquat이 흡착된 점토광물에 직접 처리된 α -cyclodextrin의 영향을 조사한 결과는 표 3-30과 같다. Montmorillonite의 경우 α -cyclodextrin의 첨가에 의해 1,000 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$ 처리구에서 13.5%, kaolinite의 경우 1,000 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ 처리구에서 8.9% 유출되어 나오는 것으로 나타났다.

Table 3-30. Effect of α -cyclodextrin for eluting of adsorbed paraquat on the clay minerals

Clay minerals	Concentration	Concentration of paraquat (mg/kg)	
		10% α -cyclodextrin (1.0 ml)	
		No addition	Addition
Montmorillonite	100 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$	N.D.	N.D.
	500 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$	N.D.	N.D.
	1000 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$	9.83	11.16
Kaolinite	100 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$	N.D.	N.D.
	500 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$	N.D.	N.D.
	1000 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$	6.54	7.12

2) Paraquat의 제거에 대한 incubation time의 영향

α -Cyclodextrin을 첨가하여 incubation time을 변화시켜 흡착된 paraquat의 제거 정도를 조사한 결과는 표 3-31과 같다. Incubation time을 2, 15, 30일로 변화시킨 경우 paraquat의 제거율은 각각 63.7, 63.4, 85.6%로 2일간과 15일간 incubation한 경우를 비교하면 큰 변화가 없었지만 30일간 incubation한 경우에는 paraquat의 제거율이 약 22%정도 증가함을 볼 수 있었다. 즉 incubation time이 길어지면 paraquat의 제거가 더욱 효과적임을 알 수 있다.

Table 3-31. Effect of α -cyclodextrin for removal of paraquat by different incubation time

Conc. of paraquat (mg/kg)	Removal rate of paraquat (%)		
	Incubation time (days)		
	2	15	30
10	63.7	63.4	85.6

3) Paraquat의 제거에 대한 incubation temperature의 영향

α -Cyclodextrin을 첨가하여 incubation temperature를 변화시켜 흡착된 paraquat의 제거 정도를 조사한 결과는 표 3-32와 같다. Incubation temperature를 4, 28, 56℃로 변화시켰을 때 paraquat의 제거율은 각각 54.1, 63.7, 32.9%로 28℃일 경우에 paraquat의 제거율이 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 3-32. Effect of α -cyclodextrin for removal of paraquat by different incubation temperature

Conc. of paraquat (mg/kg)	Removal rate of paraquat (%)		
	Incubation temperature (°C)		
	4	28	56
10	54.1	63.7	32.9

4) Dehydrogenase 활성에 미치는 영향

α -Cyclodextrin 첨가에 의한 paraquat의 제거에서 미생물의 영향을 간접적으로 확인하기 위하여 dehydrogenase 활성을 측정한 결과는 표 3-33과 같다. α -Cyclodextrin을 첨가한 처리구의 dehydrogenase 활성이 첨가하지 않은 처리구에 비하여 더 높음을 알 수 있었다.

Table 3-33. Effect of α -cyclodextrin on dehydrogenase activity of soil treated with paraquat

Treatment	Dehydrogenase activity (units)			
	Incubation time (days)			
	0	1	2	4
Control	1.54	0.91	0.84	0.69
α -Cyclodextrin	3.74	1.94	0.35	0.31

5) Glucose 첨가의 영향

α -Cyclodextrin에 의한 토양에 흡착된 paraquat의 제거에 대한 D-glucose의 영향을 확인하기 위하여 D-glucose를 첨가한 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 조사한 결과는 표 3-34와 같다. D-glucose를 단독으로 처리한 경우에는 paraquat의 제거율이 8.1%로 제거 효과가 매우 낮았고, α -cyclodextrin과 D-glucose를 혼합 처리한 경우의 제거율은 63.6%로 α -cyclodextrin 단독으로 처리한 경우의 제거율 54.6%보다 9.0% 더 높은 제거 효과를 얻을 수 있었다.

Table 3-34. Effect of addition of D-glucose and α -cyclodextrin for removal of paraquat

Conc. of paraquat (mg/kg)	Removal rate of paraquat (%)		
	D-glucose	α -Cyclodextrin	D-glucose + α -Cyclodextrin
10	8.1	54.6	63.6

α -Cyclodextrin과 D-glucose의 단독 혹은 혼합 처리한 paraquat이 흡착된 토양의 dehydrogenase 활성을 측정한 결과는 표 3-35와 같다. 각각의 경우에서 D-glucose를 첨가한 경우의 dehydrogenase 활성이 그렇지 않은 처리구에 비해 더 높게 나타났다. 따라서 D-glucose에 의해 potential dehydrogenase 활성까지도 측정 가능하였고 그 결과는 위 결과와 마찬가지로 α -cyclodextrin을 첨가한 처리구의 dehydrogenase 활성이 α -cyclodextrin을 첨가하지 않은 처리구에 비하여 더 높음을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

Table 3-35. Dehydrogenase activity by addition of D-glucose and α -cyclodextrin in soil treated with paraquat

Treatment	Dehydrogenase activity (units)		
	Incubation time (days)		
	0	1	2
Control	7.72	6.52	4.45
D-glucose	8.62	7.00	6.96
α -Cyclodextrin	12.93	6.30	5.47
D-glucose + α -Cyclodextrin	19.96	7.83	6.32

제5절 Paraquat으로 오염된 토양의 화학적 복원

1. 서론

자연적인 방법을 이용하여 paraquat을 제거할 수 있는 방법을 모색하기 위하여 현재 비료로서 사용하고 있는 ammonium thiosulfate (ATS)를 이용하여 paraquat 제거 양상을 규명하고자 하였다. 그리고 앞서 이용한 SAC-WB (strong adsorption capacity measured using wheat bioassay) 조사를 통하여 ATS에 의해 제거된 paraquat의 식물체에 대한 영향을 규명하고자 하였다. 또한 실내 실험의 결과를 바탕으로 실제 토양 조건에서 ATS의 paraquat 제거 효과를 확인하기 위하여 실제 포장에서 동일한 실험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 흡착된 paraquat의 ATS에 의한 제거

1) ATS의 molar ratio 변화에 따른 영향

ATS의 첨가량 변화에 따른 토양 중 paraquat의 분해양상을 조사하기 위하여 paraquat이 흡착된 토양 25 g에 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1, 8:1, 12:1, 16:1, 20:1로 처리하여 28℃에서 2일간 incubation시킨 후 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

2) 포장용수량의 영향

ATS 첨가에 의한 paraquat의 제거에 영향을 미치는 포장용수량의 영향을 확인하기 위하여 paraquat이 흡착된 토양 25 g에 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1로 첨가하여 포장용수량을 50, 100, 150, 200, 250%로 변화시켜 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

3) Incubation time의 영향

ATS 첨가에 의한 paraquat의 제거에 영향을 미치는 incubation time의 영향을 확인하기 위하여 paraquat이 흡착된 토양 25 g에 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1로 첨가하여 incubation time을 2, 10, 20일로 변화시켜 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

4) Incubation temperature의 영향

ATS 첨가에 의한 paraquat의 제거에 영향을 미치는 incubation temperature의 영향을 확인하기 위하여 paraquat이 흡착된 토양 25 g에 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1로 첨가하여 incubation temperature를 4, 28, 56℃로 변화시켜 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

5) 식물체에 대한 영향

ATS의 첨가에 따른 밀 생육의 영향을 관찰하기 위하여 사용된 토양의 SAC-WB 값에 해당하는 농도인 240 mg/kg의 paraquat이 흡착된 토양 10 g에 ATS와 paraquat의 molar ratio를 12:1로 첨가하여 SAC-WB 조사 방법에 의하여 식물 생육에의 영향을 조사하였다.

나. ATS에 의한 paraquat의 제거 효과 - 포장실험

포장은 그림 3-10과 같이 배치하였다. 각 처리구의 크기는 가로 50 cm, 세로 50 cm, 토양 깊이 10 cm로 계산하였고 각 처리구당 간격은 30 cm로 하였다.

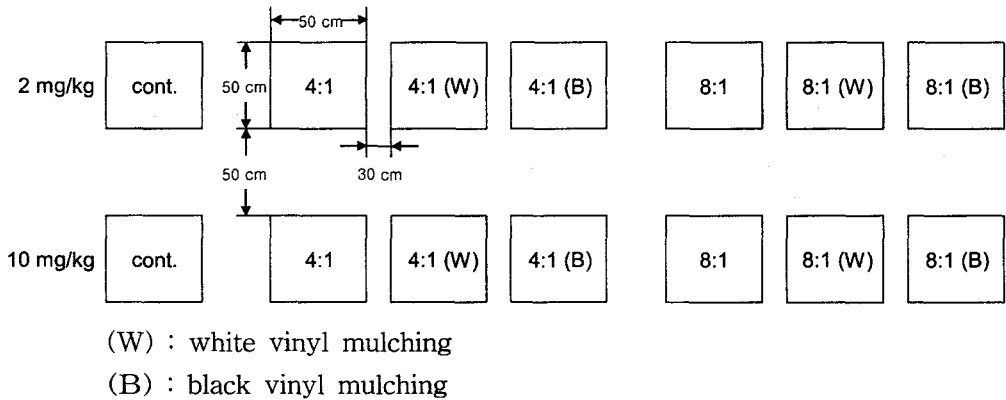


Fig. 3-10. Field arrangement for experiment on the removal of paraquat by ATS.

1) ATS의 첨가량에 따른 영향

실제 토양 조건에서 ATS의 첨가량에 따른 제거 효과를 확인하기 위하여 2 mg/kg 그리고 10 mg/kg의 paraquat이 흡착된 토양에 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1, 8:1로 첨가하여 시간별로 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

2) Paraquat의 농도에 따른 영향

실제 토양 조건에서 paraquat의 농도에 따른 ATS의 제거 효과를 확인하기 위하여 paraquat의 살포량을 2 mg/kg 그리고 10 mg/kg으로 처리하고 각각의 토양에 대해 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1, 8:1로 첨가하여 시간별로 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

3) 비닐 멀칭에 의한 영향

ATS에 의한 paraquat의 제거에서 온도가 높을수록 반응 효과가 뛰어난 실내실험의 결과를 바탕으로 반응 온도를 높여주기 위한 방법으로 비닐 멀칭을 하였다. 또한 비닐 재료에 따른 제거 효과를 확인하기 위하여 흰색 비닐과 검정색 비닐을 각각 사용하였다. 2 mg/kg 그리고 10 mg/kg의 paraquat이 흡착된 토양에 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1, 8:1로 첨가한 후 각각에 대하여 흰색 비닐과 검정색 비닐로 멀칭하여 시간별로 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다.

4) 반응 시간에 따른 영향

ATS에 의한 paraquat제거에서 반응 시간에 따른 제거 효과를 확인하기 위하여 paraquat의 살포량을 2 mg/kg 그리고 10 mg/kg으로 처리하고 각각의 토양에 대해 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1, 8:1로 첨가하여 시간별 (2, 10, 20, 30일)로 토양에 잔존하는 paraquat의 양을 분광광도계로 정량하였다. 또한 비닐 멀칭한 처리구에 대해서도 동일한 방법으로 실험하였다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 흡착된 paraquat의 ATS에 의한 제거

1) ATS의 molar ratio 변화에 따른 영향

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 ATS의 영향을 조사하기 위해 ATS와 paraquat의 molar ratio를 변화시켜 첨가한 결과는 표 3-36과 같다. ATS:PQ molar ratio를 4:1, 8:1, 12:1, 16:1, 20:1로 처리한 경우 paraquat의 제거율은 34.4, 39.8, 47.7, 40.6, 35.9%로 ATS에 의한 paraquat의 제거 효과가 나타났다. 또한 첨가해 준 ATS의 농도가 높을수록 paraquat의 제거가 더 효과적임을 알 수 있었다.

Table 3-36. Effect of ammonium thiosulfate on the removal of paraquat under different ATS:PQ molar ratio condition

Conc. of paraquat (mg/kg)	Removal rate of paraquat (%)				
	Treatment molar ratio of ATS (ATS : paraquat)				
	4:1	8:1	12:1	16:1	20:1
10	34.4	39.8	47.7	40.6	35.9

2) 포장용수량의 영향

ATS에 의한 paraquat의 제거에 영향을 주는 인자 중 첫 번째로 포장용수량을 변화시켜 분석한 결과는 표 3-37과 같다. 포장용수량을 50, 100, 150, 200, 250%로 변화

시켰을 때 paraquat의 제거율은 각각 44.3, 47.0, 58.4, 59.0, 59.0%로 field capacity가 많을수록 paraquat의 제거가 더 효과적임을 알 수 있었다.

Table 3-37. Effect of field capacity on the removal of paraquat in ATS-amended soil

Conc. of paraquat (mg/kg)	Removal rate of paraquat (%)				
	Field capacity (%)				
	50	100	150	200	250
10	44.3	47.0	58.4	59.0	59.0

3) Incubation time의 영향

ATS에 의한 paraquat의 제거에 영향을 주는 인자 중 두 번째로 incubation time을 변화시켜 분석한 결과는 표 3-38과 같다. incubation time을 2, 10, 20일간으로 두었을 때 paraquat의 제거율은 각각 39.8, 46.4, 46.7%로 incubation time이 길어지면 paraquat의 제거가 더 효과적임을 알 수 있었다.

Table 3-38. Effect of incubation time on the removal of paraquat in ATS-amended soil

Conc. of paraquat (mg/kg)	Removal rate of paraquat (%)		
	Incubation time (days)		
	2	10	20
10	39.8	46.4	46.7

4) Incubation temperature의 영향

ATS에 의한 paraquat의 제거에 영향을 주는 인자 중 세 번째로 incubation temperature를 변화시켜 분석한 결과는 표 3-39와 같다. Incubation temperature를 4, 28, 56°C로 변화시켰을 때 paraquat의 제거율은 각각 12.9, 39.8, 70.7%로 incubation temperature가 낮은 경우에는 제거 효과가 매우 낮고, incubation temperature가 높아 질수록 paraquat의 제거가 더 효과적임을 알 수 있었다.

Table 3-39. Effect of incubation temperature on the removal of paraquat in ATS-amended soil

Conc. of paraquat (mg/kg)	Removal rate of paraquat (%)		
	Incubation temperature (°C)		
	4	28	56
10	12.9	39.8	70.7

5) SAC-WB 조사를 통한 ATS에 의해 제거된 paraquat의 식물체에 대한 영향

ATS의 첨가에 의한 흡착된 paraquat의 밀 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 3-40과 같다. 사용된 토양의 SAC-WB 값에 해당하는 240 mg/kg수준으로 처리된 paraquat의 농도에서 ATS를 첨가하였을 경우 paraquat에 의한 뿌리 성장 저해가 나타나지 않고 밀 생육이 정상적으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

Table 3-40. Effect of ATS on the growth of wheat root at 240 mg/kg concentration of paraquat

Concentration of paraquat (mg/kg)	Length of wheat root (cm) *	
	Treatment molar ratio of ATS (ATS : paraquat)	
	0	12 : 1
240	8.2 ± 1.0	20.8 ± 1.3

* mean of six replication of longest root

나. ATS에 의한 paraquat의 제거 효과 - 포장실험

1) ATS의 첨가량에 따른 영향

실제 토양 조건에서 ATS의 첨가량에 따른 제거 효과를 확인한 결과는 표 3-41 및 표 3-42와 같다. 2 mg/kg의 paraquat이 흡착된 토양에서는 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1로 첨가한 경우 최대 제거율이 25.9%, 8:1로 첨가한 경우 29.6%였으며, 10 mg/kg의 paraquat이 흡착된 토양에서는 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1로 첨가한 경우 최대 제거율이 25.8%, 8:1로 첨가한 경우 37.9%였다. ATS의 첨가량이 증가할수록 제거율이 다소 증가하는 것을 볼 수 있었고 paraquat의 농도가 높을 때 ATS의 첨가량 증가 효과가 더 확실히 나타남을 확인할 수 있었다.

Table 3-41. Effect of different ATS to paraquat molar ratio on the removal of paraquat under soil sorbed with paraquat of 2 mg/kg

Time (days)	Removal rate of paraquat (%)		
	Treatment molar ratio of ATS (ATS:paraquat)		
	0	4:1	8:1
2	7.2	7.4	11.1
10	7.2	14.8	18.5
20	17.9	25.9	29.6
30	21.4	25.9	29.6

Table 3-42. Effect of different ATS to paraquat molar ratio on the removal of paraquat under soil sorbed with paraquat of 10 mg/kg

Time (days)	Removal rate of paraquat (%)		
	Treatment molar ratio of ATS (ATS:paraquat)		
	0	4:1	8:1
2	0.0	1.5	3.0
10	4.7	18.2	22.4
20	9.4	25.8	36.4
30	15.6	24.3	37.9

2) Paraquat의 농도에 따른 영향

실제 토양 조건에서 paraquat의 농도에 따른 ATS의 제거 효과를 확인한 결과는 표 3-41 및 표 3-42와 같다. ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1로 처리한 토양에서는 2 mg/kg의 paraquat이 흡착된 토양의 경우 최대 제거율이 25.9%, 10 mg/kg이 흡착

된 경우 25.8%였으며, ATS와 paraquat의 molar ratio를 8:1로 처리한 토양에서는 2 mg/kg의 paraquat이 흡착된 토양의 경우 최대 제거율이 29.6%, 10 mg/kg이 흡착된 경우 37.9%였다. paraquat이 저농도 (2 mg/kg) 혹은 고농도 (10 mg/kg)로 흡착된 경우 모두 ATS에 의한 제거효과가 나타났으며 고농도 (10 mg/kg)의 경우에 ATS에 의한 제거가 더 효과적임을 알 수 있었다.

3) 비닐 멀칭에 의한 영향

ATS에 의한 paraquat의 제거에서 비닐멀칭에 의한 효과를 확인한 결과는 표 3-43 및 표 3-44와 같다. 비닐 멀칭을 하였을 경우 그렇지 않은 경우보다 제거 효과가 높은 것을 볼 수 있었다. 예를 들어 10 mg/kg의 paraquat이 흡착된 토양의 경우 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1로 첨가하여 비닐 멀칭을 한 경우 제거율이 38.3%로, 비닐 멀칭을 하지 않은 경우의 제거율 25.8%보다 약 12%정도 높음을 알 수 있었다. 또한 비닐 재료에 따른 제거 효과를 확인한 결과 흰색 비닐과 검정색 비닐에 대해 큰 차이는 없었지만 검정색 비닐로 멀칭한 경우 약 5-10%정도 제거효과가 높음을 확인할 수 있었고 이는 2 mg/kg의 paraquat이 흡착된 경우에 뚜렷이 나타났다. 즉 2 mg/kg의 paraquat이 흡착된 토양에서 ATS와 paraquat의 molar ratio를 4:1로 첨가하여 흰색 비닐로 멀칭한 경우 최대 제거율이 25.1%, 검은색 비닐로 멀칭한 경우 35.7%였다.

4) Incubation time에 따른 영향

ATS에 의한 paraquat제거에서 incubation time에 따른 제거 효과를 확인한 결과는 위에서 나타낸 표 3-41~44의 결과에서 확인할 수 있다. 실내 실험과는 조금 다르게 반응이 일어나는 데는 시간이 다소 소요되었고 시간이 지날수록 ATS에 의한

paraquat의 제거율이 높아짐을 확인할 수 있었다. 그러나 20일 이후에는 더 이상의 제거율 증가는 나타나지 않았다. 전체적으로, 포장 실험의 결과 ATS에 의한 paraquat의 제거율이 실내 실험에서의 제거율보다 다소 낮기는 하였으나 어느 정도 효과가 있는 것으로 생각된다.

Table 3-43. Effect of vinyl mulching on the removal of paraquat in ATS-amended soil sorbed with paraquat of 2 mg/kg

Time (days)	Removal rate of paraquat (%)			
	Treatment molar ratio of ATS (ATS:paraquat)			
	4:1		8:1	
	white vinyl	black vinyl	white vinyl	black vinyl
2	10.7	7.2	14.8	17.9
10	17.9	21.4	25.9	32.2
20	25.0	32.2	33.3	32.2
30	25.1	35.7	33.3	35.8

Table 3-44. Effect of vinyl mulching on the removal of paraquat in ATS-amended soil sorbed with paraquat of 10 mg/kg

Time (days)	Removal rate of paraquat (%)			
	Treatment molar ratio of ATS (ATS:paraquat)			
	4:1		8:1	
	white vinyl	black vinyl	white vinyl	black vinyl
2	5.9	5.9	7.6	9.2
10	23.5	25.0	24.3	26.2
20	38.2	38.2	36.3	38.5
30	38.3	39.7	39.4	40.0

그리고 첨가되어진 ATS의 양이 많을수록, 비닐 멀칭을 하여 반응 온도가 높을수록 그리고 반응 시간이 지날수록 ATS에 의한 paraquat의 제거가 효과적임을 알 수 있었다. 또한 이는 실험에 적용된 두 가지 paraquat의 농도 (2 mg/kg, 10 mg/kg)에 대해서 같은 결과를 나타내었다. 따라서 현재 비료로 사용되고 있는 ATS를 paraquat으로 오염된 토양의 화학적 복원에 이용하는데 효과적일 것으로 생각된다.

제6절 결 론

토양 중에서 제초제인 paraquat의 동태를 명확히 규명하기 위한 연구로서 토양 중에서의 흡·탈착 양상과 paraquat으로 오염된 토양으로부터 식물체로의 이행 가능성과 그 화학적 복원 방법에 대한 연구를 수행한 결과들은 다음과 같다.

Paraquat의 흡착에 미치는 경쟁 양이온의 영향은 유기물 (humic acid and fulvic acid), 토양시료 (soil A and soil B), 점토광물 (montmorillonite and kaolinite)의 순으로 크게 나타났고, 양이온으로 포화되어 있는 흡착제에 대한 paraquat의 흡착 시험에서 점토광물은 유기물이나 토양 시료에 비하여 높은 흡착율을 보여 주었으며 유기물이 흡착제로 존재할 경우, Na^+ , Ca^{2+} 또는 Cu^{2+} 이온은 paraquat의 흡착에 상당한 영향을 미쳤다. 그리고 토양 수분함량은 paraquat의 토양에 대한 흡착에 영향을 미치지 않았다. Microwave를 이용한 토양에 결합된 paraquat의 추출에 대한 시험 결과, microwave로 추출할 경우가 환류하여 추출하는 경우보다 추출시간이 15배 단축되었고, 회수율은 약 1.2배 높은 수준으로 나타났다.

강한 산화제로 알려진 fenton 시약을 처리하면 paraquat의 분해반응은 수용액 내에서 24시간 이내에 종결되었고, 암조건에서 반응시키면 농도에 따라 51-69%, UV광이 조사되는 조건에서는 60-95%의 분해율을 보였다. 그리고 Fe^{3+} 의 농도가 높아질수

록 분해율이 증가하고 paraquat의 농도와 H₂O₂의 농도에 따른 분해율의 차이는 나타나지 않았다. Hydroxyl radical의 생성에 의해 paraquat의 분해가 이루어지는지를 조사하기 위하여 hydroxyl radical과 같은 free radical들을 제거하는 것으로 알려진 mannitol을 첨가하여 반응을 조사한 결과, fenton 시약과 UV에 의한 paraquat의 분해 반응은 hydrogen peroxide에서 생성된 hydroxyl radical에 의하여 발생함을 알 수 있었다. 암조건에서 TiO₂를 처리한 경우에는 paraquat은 13% 분해되었고, H₂O₂를 TiO₂와 함께 반응시킨 경우는 8%가 전환되었다. UV를 조사하는 반응 조건에서 TiO₂만을 처리했을 경우 82%, H₂O₂만 처리했을 경우는 9%, TiO₂와 H₂O₂를 함께 반응시킨 결과 90%가 분해되었다.

포장시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기는 0.15 kg a.i./10 a 수준으로 처리한 구에서는 203일, 0.29 kg a.i./10 a 수준으로 처리한 구에서는 330일로 나타났다. 실내 시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기는 2.5 mg/kg이 처리된 구에서는 231일, 5.0 mg/kg이 처리된 구에서는 433일로 나타났다. 또한 토양에 흡착된 paraquat의 물에 의한 탈착 가능성을 조사한 결과 물에 의한 진탕추출 및 환류추출은 토양으로부터의 paraquat 탈착에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 이는 토양과 강하게 결합되어 있는 paraquat이 강우에 의해 탈착되어 이동되어질 가능성이 없음을 시사한다. Paraquat의 탈착은 사용되어진 pH 범위에 관계없이 이루어지지 않았다. 이로써 토양에 흡착된 paraquat은 pH 5.6이하의 산성비에 의해 탈착될 가능성은 없는 것으로 사료된다. 또한 계면활성제의 첨가에 의해서도 탈착은 어려울 것으로 사료된다. 토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 incineration 온도의 영향을 조사한 결과 토양에 흡착된 paraquat을 효과적으로 분해시키기 위해서는 400℃ 이상의 incineration 온도에서 최소 2시간 이상의 incineration time이 요구되어지는 것으로 나타났다. 토양 중에 흡착되어 있는 paraquat은 벧짚이나 건초 등을 토양 위에서 연소시켜도 분해되지 않을 것으로 예측된다.

한편 미생물에 의한 paraquat의 분해 양상을 조사한 결과 10 ppm과 50 ppm의

paraquat이 처리된 MCY 배지에서 토양미생물인 *O. anthropi*와 paraquat 내성유전자를 포함하는 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*에 의한 paraquat의 분해 양상을 조사하였을 때 10 ppm의 paraquat이 처리된 구의 경우 최종 배양기간에 걸쳐 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*가 6.5%, *O. anthropi*가 29.4%의 paraquat을 분해하는 것으로 나타났다. 10 ppm의 paraquat이 처리된 구에서 두 균주의 생육 정도의 차이가 크지 않았다는 것을 고려할 때 10 ppm의 paraquat을 분해시킬 수 있는 능력이 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 더 크다는 것을 알 수 있다. 그리고 50 ppm의 paraquat이 처리된 구에서 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 생육 정도가 1.7배 높게 나타나 50 ppm의 paraquat을 분해시킬 수 있는 능력 및 생육정도가 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 더 크다는 것을 알 수 있다.

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 α -cyclodextrin의 영향을 조사한 결과 비담수 토양에 첨가한 경우 71.0%의 paraquat 분해율을 나타내었고 첨가농도가 증가됨에 따라 paraquat의 분해율도 증가되는 경향을 보였다. 또한 incubation time이 길어지면 paraquat의 제거가 더욱 효과적이었으며 최대 85.6%까지 제거되는 결과를 나타내었다. α -Cyclodextrin에 의한 토양중 paraquat의 제거 가능성을 바탕으로 흡착된 paraquat의 식물체로의 이행 가능성을 SAC-WB (strong adsorption capacity measured using wheat bioassay) 조사를 통하여 규명하고자 하였다. 본 실험에 사용된 토양의 SAC-WB 값은 약 240 mg/kg이었다. α -Cyclodextrin 첨가에 의한 paraquat의 유출 현상에 의한 밀 뿌리의 성장을 조사한 결과, α -cyclodextrin의 첨가에 의해서는 거의 유출되지 않아서 밀 뿌리의 성장에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 ammonium thiosulfate (ATS)의 영향을 조사하기 위해 ATS와 paraquat의 molar ratio를 변화시켜 첨가한 결과 첨가해 준 ATS의 농도가 높을수록, 포장용수량이 많을수록, incubation time이 길어질수록, incubation temperature가 높아질수록 paraquat의 제거가 더 효과적이었으며 최대

70.7%까지 제거되는 결과를 나타내었다. 또한 SAC-WB 조사를 통하여 ATS의 첨가에 의한 흡착된 paraquat의 밀 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 사용된 토양의 SAC-WB 값에 해당하는 240 mg/kg 수준으로 처리된 paraquat의 농도에서 ATS를 첨가하였을 경우 paraquat에 의한 뿌리 성장 저해가 나타나지 않고 밀 생육이 정상적으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

또한 실내 실험의 결과를 바탕으로 실제 토양 조건에서 ATS의 paraquat 제거 효과를 확인하기 위하여 포장에서 동일한 실험을 실시한 결과 ATS에 의한 paraquat의 제거율이 실내 실험에서의 제거율보다 다소 낮기는 하였으나 어느 정도 효과를 나타내었으며 그 경향도 일치하였다. 즉, 첨가되어진 ATS의 양이 많을수록, 비닐 멀칭을 하여 반응 온도가 높을수록, 그리고 incubation time이 길어질수록 ATS에 의한 paraquat의 제거가 효과적임을 알 수 있었다. 또한 이는 실험에 적용된 두 가지 paraquat의 농도 (2 mg/kg, 10 mg/kg)에 대해서 같은 결과를 나타내었다.

현재 ATS는 비료로 사용되고 있는 물질로써 쉽게 이용할 수 있으며 비닐 멀칭을 통하여 그 효과를 증가시킬 수 있는 장점이 있어서 ATS를 paraquat으로 오염된 토양의 화학적 복원에 이용하는데 효과적일 것으로 생각된다.

제 4 장 종합 결론

본 연구에서는 paraquat 내성유전자의 발현기구의 해명을 위하여 토양으로부터 선발한 paraquat 내성 미생물인 *Ochrobactrum anthropi* JW-2의 genomic DNA로부터 paraquat 내성유전자 (*pqrA*)와 조절단백질 유전자 (*pqrR1*과 *pqrR2*)를 분리하여 그 특성을 규명한 다음, *pqrA* 유전자를 모델식물인 담배에 형질전환하여 *pqrA* 유전자의 과발현에 의한 paraquat 내성의 획득을 확인하였다. Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 화분과 목초인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스의 캘러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립한 다음, *pqrA* 유전자를 형질전환하여 paraquat에 대한 내성의 획득을 확인하였다. 또한 토양 중에서 paraquat의 흡·탈착 양상과 paraquat으로 오염된 토양으로부터 식물체로의 이행 가능성과 그 화학적 복원 방법에 대한 연구를 수행함으로써 토양 중에서 paraquat의 동태를 규명하였다. 이상의 결과를 과제별로 요약하면 다음과 같다.

가. 제 1 세부과제 : 「Paraquat 내성유전자의 발현기구 해명 및 paraquat 내성목초 개발」과 관련된 연구개발 결과

Paraquat 내성유전자의 발현기구의 해명을 위하여 토양으로부터 선발한 paraquat 내성 미생물인 *Ochrobactrum anthropi* JW-2의 genomic DNA로부터 paraquat 내성 유전자 (*pqrA*)와 조절단백질 유전자 (*pqrR1*과 *pqrR2*)를 분리하여 그 특성을 규명하였다. Paraquat 내성유전자 (*pqrA*)를 모델식물인 담배에 형질전환한 다음, *pqrA* 유전자의 과발현에 의한 paraquat 내성의 획득을 확인하였다. Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 화분과 목초인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스의 캘러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립한 다음, *pqrA* 유전자를 형질전환하여 paraquat에 대한 내성의 획득을 확인하였으며, 이상의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) Paraquat 내성유전자의 선발

토양으로부터 비선택성 제초제인 paraquat에 내성을 가지는 미생물 JW-2를 분리하였다. 분리한 미생물의 형태학적, 생리, 생화학적 특성 및 세포지방산 조성 등을 조사한 결과, 분리 균주 JW-2는 *Ochrobactrum anthropi*로 동정되었으며 최종적으로 *O. anthropi* JW-2로 명명하였다. Paraquat에 대한 내성을 대조균인 *E. coli* JM105와 비교하였을 때 paraquat 100 mM에서 *E. coli* JM105는 전혀 성장하지 못하였으나, *O. anthropi*는 paraquat 무첨가구와 비교하였을 때 약 70% 정도까지 성장하였다.

Paraquat 처리시 대조균인 *E. coli* JM105는 superoxide dismutase (SOD)의 활성이 증가하였으나 *O. anthropi* JW-2는 SOD 활성의 변화를 나타내지 않아 paraquat에 대한 내성이 세포 내 항산화효소의 활성 증가에 의한 것이 아닌 다른 방어기작으로 인한 것임을 나타내었다. *O. anthropi* JW-2는 paraquat과 같은 redox-cycling compound인 plumbagin과 menadione에 대해서는 내성을 나타내지 않았으며, paraquat 이외의 다른 농약류에 대해서도 내성을 나타내지 않았다. 따라서, *O. anthropi* JW-2가 paraquat에 대하여 내성을 가지는 것은 세포막 단백질의 작용에 의해 paraquat이 세포 내로 유입되는 것을 선택적으로 저해하거나, 세포 내로 유입된 paraquat을 세포 외로 능동적으로 배출하는 작용에 의한 것으로 추정되었다.

O. anthropi JW-2의 genomic DNA library로부터 *E. coli*에 paraquat 내성을 부여하는 2.5 kb DNA 단편을 cloning하였다. 2.5 kb의 DNA 단편이 도입된 *E. coli*는 대조구보다 6배 이상 높은 paraquat 내성을 나타내었으며, 이 DNA 단편을 *pqr*로 명명하였다. *pqr* 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 총 길이는 2,520 bp였으며, 한 개의 완전한 ORF와 두 개의 불완전한 ORF로 구성되어 있었다. 발견된 한 개의 완전한 ORF인 *orf1* (position 643-1875)은 1,230 bp와 410개의 아미노산으로 구성되어 있었고 추정되는 단백질의 분자량은 42 kDa이었다. 또한 *orf1*의 5' 상류에는 원핵생물 유전자의

공통 promoter 서열인 TTGACA (-35)와 TTTAAT (-10)가 개시코돈 ATG로부터 각각 80 bp와 56 bp 상류영역에 존재하였으며, ribosome binding site (AAGGA)도 개시코돈으로부터 10 bp 상류영역에 존재하는 것으로 나타났다. 따라서, *orf1*을 *pqrA* 유전자로 명명하였고, 그 유전자 산물을 PqrA로 명명하였다.

2) Paraquat 내성유전자의 특성 및 발현기구 해명

PqrA 단백질은 hydrophobic 잔기가 전체 아미노산 잔기의 53%를 차지하였으며, 11개의 transmembrane helices 구조로 되어 있었다. 또한, helix 5와 6 사이에는 membrane의 cytoplasmic side로 추정되는 큰 hydrophilic loop가 있었다. BLAST system을 이용하여 PqrA의 아미노산 서열의 상동성을 검색해 본 결과, 약제 내성 및 transporter 단백질들과 상동성을 나타내었는데 특히, EmrB, SmvA, TetA 그리고 LmrP와 같은 membrane transporter로 기능하는 단백질들과 높은 상동성을 나타내었다.

pqrA 유전자를 도입한 *E. coli*의 활성산소 발생 약제들에 대한 특이성을 조사한 결과, menadione과 plumbagin에 대해서는 내성을 나타내지 않았다. 그러나 paraquat과 같은 pyridylum계 제초제인 diquat과 paraquat과 같은 양이온 화합물인 ethidium-bromide (EtBr)에 대해서는 내성을 나타내었다. PqrA의 *O. anthropi* JW-2에서의 존재 위치를 immunoblot 분석으로 조사한 결과 PqrA 단백질은 membrane fraction에서만 관찰되었다. 이상의 결과로부터 PqrA 단백질은 paraquat이 세포 내로 유입되는 것을 저해하거나 세포 내로 유입된 paraquat을 세포 밖으로 배출시킴으로써 paraquat 내성을 부여하는 것으로 판단되었다. *pqrA* 유전자의 발현 양상을 조사하기 위하여 paraquat을 처리한 다음 northern blot 분석을 실시한 결과, 발현량의 차이를 나타내지 않아서 *pqrA* 유전자가 paraquat에 의해 발현이 유도되는 것이 아니라 항상적으로 발현하는 유전자임을 알 수 있었다.

pqrA 유전자와 인접해있는 *orf2* 및 *orf3*의 full-length clone을 각각 분리한 다음, DNA 염기서열을 결정하여 분석한 결과, 이들은 미생물 유래의 transcriptional regulator 단백질들과 높은 상동성을 나타내었다. 따라서 이들 유전자들을 각각 *pqrR1* (*orf2*)과 *pqrR2* (*orf3*)로 명명하였다.

pqrA 유전자의 발현조절 기구의 해명을 위하여 *pqrA*, *pqrR1* 및 *pqrR2*의 각각의 유전자, 유전자 조합 및 deleted-sequences로 구성된 construct를 구축하여 *E. coli*에 형질전환한 다음, paraquat 처리 후 성장률을 조사하였다. 그 결과, *pqrR1* 및 *pqrR2* 산물은 paraquat 내성과는 직접적인 연관성이 없으며, *pqrA* 산물이 paraquat 내성에 직접 관여하는 것으로 나타났다. 또한, *pqrA* 유전자의 발현 조절에는 *pqrR1* 및 *pqrR2*가 직접 관여하지 않고 *pqrR1*의 partial sequence (2,383~2,875 bp)가 *pqrA* 유전자의 항상적인 발현과 이를 통한 paraquat 내성획득에 있어 enhancer sequence로서의 기능을 수행하는 것으로 추정되었다.

3) Paraquat 내성유전자의 모델 식물로의 도입 및 내성 획득

pqrA 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector인 pGA748의 CaMV 35S promoter 하류에 연결하여 모델식물인 담배에 형질전환하였다. Southern blot 분석을 실시하여 *pqrA* 유전자의 도입을 확인한 다음, northern blot 및 immunoblot 분석을 실시하여 형질전환 담배 내에서 *pqrA* 유전자가 정상적으로 전사 및 번역되어 아미노산 서열로부터 추정되는 분자량 42 kDa의 PqrA 단백질이 membrane fraction에 축적된다는 것을 확인하였다.

형질전환 및 도입된 유전자의 정상적인 발현이 확인된 T₀ 식물체의 자가수정을 통하여 T₁ 종자를 채종하였다. T₁ 종자의 kanamycin 감수성을 확인한 결과, 모든 개체가 3:1의 분리비를 나타내어 *pqrA* 유전자가 담배의 genome에 1 copy씩 도입되었음을 확인하였다. Homozygous line을 확립하고자 T₁ 식물체의 자가수정을 통하여 T₂

종자를 채종하여 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 과종하여 kanamycin에 의해 고사하는 개체가 하나도 없는 line을 homozygote로 선발하였다. 이와 같은 homozygous line의 선발과정을 통하여 *pqrA* 유전자가 형질전환 담배 내에서 정상적으로 유전되어 발현된다는 것을 확인하였다.

T_2 homozygous line의 형질전환 담배를 이용하여 *pqrA* 유전자의 발현량과 paraquat에 대한 내성의 획득여부를 확인한 결과, 형질전환 식물체는 PqrA 단백질의 축적량에 따라 paraquat에 대한 내성의 획득 정도가 비례하여 증가하였으며, paraquat 처리 후 chlorophyll 함량을 기초로 비교하였을 때 형질전환하지 않은 wild-type 식물체에 비해 5배 이상의 내성 증가를 나타내었다. 또한, 식물의 잎, 줄기 및 뿌리 조직의 northern blot 및 immunoblot 분석으로부터 *pqrA* 유전자는 조직 특이적으로 발현하는 것이 아니라 모든 조직에서 항상적으로 발현하고 있음을 확인하였으며, 광합성 기관인 잎에서와 마찬가지로 비광합성 기관인 뿌리에서도 paraquat에 대한 내성을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 *E. coli*에 paraquat 내성을 부여했던 *pqrA* 유전자는 고등식물에서도 정상적으로 발현되어 paraquat에 대한 내성을 부여한다는 것을 확인하였다. 또한, 고등식물 내에서도 미생물에서와 같이 PqrA 단백질이 membrane fraction에서 주로 축적되어 paraquat의 세포 내로의 유입의 차단 또는 유입된 paraquat의 세포 외로의 빠른 배출 작용으로 인하여 내성을 부여하는 transporter의 기능을 담당하는 것으로 추측되었다.

4) 목초 재분화계의 확립

Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 화본과 목초인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스를 선택하여 퀼러스 유도 및 식물체 재분화계를 확립하였다.

오차드그래스의 성숙종자 배양에서 퀼러스 형성과 식물체 재분화의 품종간 차이를 조사한 결과, 공시품종 중 Potomac의 퀼러스 생체중이 208 mg으로 가장 높았고, 식물

체 재분화율도 28%로 가장 높게 조사되었다. 또한 켈러스 생체중이 무거운 품종에서 식물체 재분화 능력과 뿌리를 형성한 켈러스의 비율이 모두 높게 나타났다. 오차드그래스의 종자배양에서 켈러스 형성과 식물체 재분화를 위한 기본배지로는 MS 배지가 가장 효과적인 것으로 나타났다. 식물 성장조절제로는 켈러스 유도시에는 3 mg/l의 2,4-D가 가장 효과적이었고, 식물체 재분화에는 1 mg/l의 NAA와 5 mg/l의 kinetin 농도가 가장 효과적이었다.

이탈리안 라이그래스의 성숙종자 배양에서 켈러스 형성과 식물체 재분화의 품종간 차이를 조사한 결과, 공시품종 중 Jeanne의 켈러스 생체중이 17.6 mg으로 가장 높았고, 식물체 재분화율도 51%로 가장 높게 조사되었다. 이탈리안 라이그래스의 종자배양에서 켈러스 형성과 식물체 재분화를 위한 기본배지로는 MS 배지가 가장 효과적인 것으로 나타났다. 식물 성장조절제로는 켈러스 유도시에는 2 mg/l의 2,4-D가 가장 효과적이었고, 식물체 재분화에는 1 mg/l의 NAA와 5 mg/l의 kinetin 농도가 가장 효과적이었다. 또한 배지 내에 첨가되는 탄소원의 영향을 조사한 결과, sucrose가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

5) Paraquat 내성목초의 개발

Paraquat 내성목초의 개발을 위하여 *pqrA* 유전자를 식물체 형질전환용 binary vector인 pIG121-Hm의 CaMV 35S promoter 하류에 도입하여 pIG-pqr2.1을 구축하였다. 또한 형질전환 목초 내에서 *pqrA* 유전자의 발현량을 증가시키기 위하여 *pqrA* 유전자를 35S promoter에 연결한 다음, 다시 35S enhancer sequence의 tetramer를 35S promoter 상위에 도입하여 pIG-Epqr1.3을 구축하였다. 구축된 construct를 각각 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101에 도입한 다음, 오차드그래스 (cv. Potomac)와 이탈리안 라이그래스 (cv. Jeanne)의 형질전환에 이용하였다.

목초 재분화계의 확립과정에서 사용한 방법을 일부 변형하여 형질전환을 실시한

결과, pIG-pqr2.1의 경우 오차드그래스에서 7개의 식물체를, 그리고 이탈리아 라이그래스에서 25개의 hygromycin 선발된 식물체를 얻었다. 또한 pIG-Epqr1.3의 경우 오차드그래스에서 5개의 식물체를, 그리고 이탈리아 라이그래스에서 22개의 재분화된 식물체를 얻었다.

재분화된 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리한 다음, *NPTII* 유전자와 35S promoter 및 *pqrA* 유전자를 이용한 construct 별 두 조합의 PCR 분석을 실시하여, 최종적으로 pIG-pqr2.1으로 형질전환된 오차드그래스 5 개체와 이탈리아 라이그래스 20 개체를 선발하였으며, pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 오차드그래스 4 개체와 이탈리아 라이그래스 17 개체를 선발하였다.

형질전환이 확인된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 내에서 *pqrA* 유전자의 발현정도를 확인하기 위하여 northern blot 분석을 실시한 결과, *pqrA* 유전자가 형질전환 목초 내에서 정상적으로 발현된다는 것을 확인하였으며, *pqrA* 유전자의 발현량은 형질전환된 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스에서 모두 개체 간의 차이가 크게 나타났다. 또한 pIG-pqr2.1로 형질전환된 목초에 비하여 pIG-Epqr1.3으로 형질전환된 목초에서의 *pqrA* 유전자의 발현량이 개체 간의 차이는 있지만 약 2~3배 이상 높은 것으로 나타났다.

pqrA 유전자의 도입과 발현이 확인된 형질전환 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 (T_0)의 잎 절편을 이용하여 paraquat에 대한 내성의 획득여부를 확인한 결과, 형질전환 목초는 대조구인 wild-type에 비하여 최대 20 μ M의 paraquat 농도까지 내성의 획득을 나타내었다. 형질전환 오차드그래스와 이탈리아 라이그래스 (T_0)는 homozygous line을 구축하여 식물체 수준에서 paraquat 내성유전자인 *pqrA*의 발현이 paraquat 내성에 미치는 영향을 조사하고, 이를 통하여 궁극적으로 paraquat 내성목초를 선발하기 위하여 현재 춘화처리 (vernalization) 후 T_1 종자를 채종 중에 있다.

나. 제 2 세부과제 : 「Paraquat의 토양 환경 중 동태」와 관련된 연구개발 결과

토양 중에서 제초제인 paraquat의 동태를 명확히 규명하기 위한 연구로서 토양 중에서의 흡·탈착 양상과 paraquat으로 오염된 토양으로부터 식물체로의 이행 가능성과 그 화학적 복원 방법에 대한 연구를 수행한 결과들은 다음과 같다.

Paraquat의 흡착에 미치는 경쟁 양이온의 영향은 유기물 (humic acid and fulvic acid), 토양시료 (soil A and soil B), 점토광물 (montmorillonite and kaolinite)의 순으로 크게 나타났고, 양이온으로 포화되어 있는 흡착제에 대한 paraquat의 흡착 시험에서 점토광물은 유기물이나 토양 시료에 비하여 높은 흡착율을 보여 주었으며 유기물이 흡착제로 존재할 경우, Na^+ , Ca^{2+} 또는 Cu^{2+} 이온은 paraquat의 흡착에 상당한 영향을 미쳤다. 그리고 토양 수분함량은 paraquat의 토양에 대한 흡착에 영향을 미치지 않았다. Microwave를 이용한 토양에 결합된 paraquat의 추출에 대한 시험 결과, microwave로 추출할 경우가 환류하여 추출하는 경우보다 추출시간이 15배 단축되었고, 회수율은 약 1.2배 높은 수준으로 나타났다.

강한 산화제로 알려진 fenton 시약을 처리하면 paraquat의 분해반응은 수용액 내에서 24시간 이내에 종결되었고, 암조건에서 반응시키면 농도에 따라 51-69%, UV광이 조사되는 조건에서는 60-95%의 분해율을 보였다. 그리고 Fe^{3+} 의 농도가 높아질수록 분해율이 증가하고 paraquat의 농도와 H_2O_2 의 농도에 따른 분해율의 차이는 나타나지 않았다. Hydroxyl radical의 생성에 의해 paraquat의 분해가 이루어지는지를 조사하기 위하여 hydroxyl radical과 같은 free radical들을 제거하는 것으로 알려진 mannitol을 첨가하여 반응을 조사한 결과, fenton 시약과 UV에 의한 paraquat의 분해반응은 hydrogen peroxide에서 생성된 hydroxyl radical에 의하여 발생함을 알 수 있었다. 암조건에서 TiO_2 를 처리한 경우에는 paraquat은 13% 분해되었고, H_2O_2 를 TiO_2 와 함께 반응시킨 경우는 8%가 전환되었다. UV를 조사하는 반응 조건에서 TiO_2 만을 처리했을 경우 82%, H_2O_2 만 처리했을 경우는 9%, TiO_2 와 H_2O_2 를 함께 반응시킨 결

과 90%가 분해되었다.

포장시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기는 0.15 kg a.i./10 a 수준으로 처리한 구에서는 203일, 0.29 kg a.i./10 a 수준으로 처리한 구에서는 330일로 나타났다. 실내 시험 조건에서의 paraquat의 분해 반감기는 2.5 mg/kg이 처리된 구에서는 231일, 5.0 mg/kg이 처리된 구에서는 433일로 나타났다. 또한 토양에 흡착된 paraquat의 물에 의한 탈착 가능성을 조사한 결과 물에 의한 진탕추출 및 환류추출은 토양으로부터의 paraquat 탈착에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 이는 토양과 강하게 결합되어 있는 paraquat이 강우에 의해 탈착되어 이동되어질 가능성이 없음을 시사한다. Paraquat의 탈착은 사용되어진 pH 범위에 관계없이 이루어지지 않았다. 이로써 토양에 흡착된 paraquat은 pH 5.6이하의 산성비에 의해 탈착될 가능성은 없는 것으로 사료된다. 또한 계면활성제의 첨가에 의해서도 탈착은 어려울 것으로 사료된다. 토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 incineration 온도의 영향을 조사한 결과 토양에 흡착된 paraquat을 효과적으로 분해시키기 위해서는 400℃ 이상의 incineration 온도에서 최소 2시간 이상의 incineration time이 요구되어지는 것으로 나타났다. 토양 중에 흡착되어 있는 paraquat은 볏짚이나 건초 등을 토양 위에서 연소시켜도 분해되지 않을 것으로 예측된다.

한편 미생물에 의한 paraquat의 분해 양상을 조사한 결과 10 ppm과 50 ppm의 paraquat이 처리된 MCY 배지에서 토양미생물인 *O. anthropi*와 paraquat 내성유전자를 포함하는 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*에 의한 paraquat의 분해 양상을 조사하였을 때 10 ppm의 paraquat이 처리된 구의 경우 최종 배양기간에 걸쳐 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*가 6.5%, *O. anthropi*가 29.4%의 paraquat을 분해하는 것으로 나타났다. 10 ppm의 paraquat이 처리된 구에서 두 균주의 생육 정도의 차이가 크지 않았다는 것을 고려할 때 10 ppm의 paraquat을 분해시킬 수 있는 능력이 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 더 크다는 것을 알 수 있다. 그리고 50 ppm의 paraquat이 처리된 구에서 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 생육

정도가 1.7배 높게 나타나 50 ppm의 paraquat을 분해시킬 수 있는 능력 및 생육정도가 pBpq2.5로 형질전환된 *E. coli*보다는 *O. anthropi*가 더 크다는 것을 알 수 있다.

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 α -cyclodextrin의 영향을 조사한 결과 비담수 토양에 첨가한 경우 71.0%의 paraquat 분해율을 나타내었고 첨가농도가 증가됨에 따라 paraquat의 분해율도 증가되는 경향을 보였다. 또한 incubation time이 길어지면 paraquat의 제거가 더욱 효과적이었으며 최대 85.6%까지 제거되는 결과를 나타내었다. α -Cyclodextrin에 의한 토양중 paraquat의 제거 가능성을 바탕으로 흡착된 paraquat의 식물체로의 이행 가능성을 SAC-WB (strong adsorption capacity measured using wheat bioassay) 조사를 통하여 규명하고자 하였다. 본 실험에 사용된 토양의 SAC-WB 값은 약 240 mg/kg이었다. α -Cyclodextrin 첨가에 의한 paraquat의 유출 현상에 의한 밀 뿌리의 성장을 조사한 결과, α -cyclodextrin의 첨가에 의해서는 거의 유출되지 않아서 밀 뿌리의 성장에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

토양에 흡착된 paraquat의 분해에 미치는 ammonium thiosulfate (ATS)의 영향을 조사하기 위해 ATS와 paraquat의 molar ratio를 변화시켜 첨가한 결과 첨가해 준 ATS의 농도가 높을수록, 포장용수량이 많을수록, incubation time이 길어질수록, incubation temperature가 높아질수록 paraquat의 제거가 더 효과적이었으며 최대 70.7%까지 제거되는 결과를 나타내었다. 또한 SAC-WB 조사를 통하여 ATS의 첨가에 의한 흡착된 paraquat의 밀 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 사용된 토양의 SAC-WB 값에 해당하는 240 mg/kg 수준으로 처리된 paraquat의 농도에서 ATS를 첨가하였을 경우 paraquat에 의한 뿌리 성장 저해가 나타나지 않고 밀 생육이 정상적으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

또한 실내 실험의 결과를 바탕으로 실제 토양 조건에서 ATS의 paraquat 제거 효과를 확인하기 위하여 포장에서 동일한 실험을 실시한 결과 ATS에 의한 paraquat의 제거율이 실내 실험에서의 제거율보다 다소 낮기는 하였으나 어느 정도 효과를 나타

내었으며 그 경향도 일치하였다. 즉, 첨가되었던 ATS의 양이 많을수록, 비닐 멀칭을 하여 반응 온도가 높을수록, 그리고 incubation time이 길어질수록 ATS에 의한 paraquat의 제거가 효과적임을 알 수 있었다. 또한 이는 실험에 적용된 두 가지 paraquat의 농도 (2 mg/kg, 10 mg/kg)에 대해서 같은 결과를 나타내었다.

현재 ATS는 비료로 사용되고 있는 물질로써 쉽게 이용할 수 있으며 비닐 멀칭을 통하여 그 효과를 증가시킬 수 있는 장점이 있어서 ATS를 paraquat으로 오염된 토양의 화학적 복원에 이용하는데 효과적일 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Akhaviain, A. A. and Linscott, D. L. 1966. The bipyridilium herbicides, paraquat and diquat, Residue Rev. 23:97-145.
2. Alemendros, G. 1995. Sorptive interaction of pesticide in soils treated with modified humic acids, European J. Soil Science 46:287-301.
3. Allard JD, Bertrand KP. 1993. Sequence of a class E tetracycline resistance gene from *Escherichia coli* and comparison of related tetracycline efflux proteins, J. Bacteriol. 175:4554-4560.
4. Aluschul S, Gish W, Miller W, Mayers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol 215:403-410.
5. Bai, Y. and R. Qu. 2001. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue, Plant Breeding 120:239-242.
6. Best, J. A., Weber, J. B. and Weed, S. B. 1972. Competition adsorption of diquat²⁺, paraquat²⁺ and Ca²⁺ on organic matter and exchange resins, Soil Science 1114:444-450.
7. Birnboim HC, Dolly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, nucleic Acid Res. 7:1513.
8. Bolhuis H, poelarends G, Veen HW, Poolman B, Driessen AJM, Konings WN. 1995. The Lactococcal lmrP gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter, J. Biol. Chem. 270:6092-26098.
9. Bollag, J. -M. 1997. New research reveals how contaminants can be "locked", into soil, Environ. Sci. Technol. 28:484-490.
10. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem. 72:248-254.

11. Brian, R. C., Horner, R. F., Stubbs, J. and Jones, R. L. 1958. A new herbicide, *Nature* 181:446-447.
12. Burns, I. G., Hayers, M. H. B. and Stacey, M. 1973a. Some Physico-chemical interactions of paraquat with soil organic materials and model compounds, I. Effects of temperature, time and adsorbate degrading on paraquat adsorption, *Weed Res.* 13:67-78.
13. Burns, I. G., Hayers, M. H. B. and Stacey, M. 1973b. Some Physico-chemical interactions of paraquat with soil organic materials and model compounds, II. Adsorption and desorption equilibria in aqueous suspensions, *Weed Res.* 13:79-90.
14. Burns, R. G. 1978. Soil enzymes, Academic press, New York, pp 19-21, 61-62, 345-346.
15. Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources, *Sci. Sinica.* 18:659-668.
16. Constenla, M. A., Rilet, D., Kennedy, S. H., Rojas, C. E. , Mora, L. E. and Stevens, J. E. B. 1990. Paraquat behavior in Costa Rican soils and residues in coffee, *J. Agric. Food Chem.* 38:1985-1988.
17. Damanakis, M., Fryer, J. D. and Holly, K. 1970. The adsorption and mobility of paraquat on different soils and soil constituents, *Weed Res.* 10:264-277.
18. Dec, J. and Bollag, J-M. 1990. Detoxification phenols by oxidoreductive enzyme through polymerization reactions, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19:543-550.
19. Fava, F., Di Gioia, D. and Marchetti, L. 1998. Cyclodextrin effects on the ex-Situ bioremediation of a chronically polychlorobiphenyl-contaminated soil, *Biotechnology and Bioengineering* 58:345-355.
20. Eizanga, G.C. and L.S. Dahleen. 1990. Callus production, regeneration and evaluation of plants from cultured inflorescences of tall fescue (*Festuca*

- arundinacea* Schreb.), Plant Cell Tiss. Org. Cult. 22:7-15.
21. Fang R.X., Nagy, F., Sivasubramanian, S., and Chua, N.-H. 1989. Multiple *cis* Regulatory Elements for Maximal expression of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter in Transgenic Plants, The plant cell 1:141-150.
 22. Feldmann KA. 1991. T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: mutational spectrum, Plant J. 1:71-82.
 23. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage A R, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, McKenney K, Sutton G, FitzHugh W, Fields C, Gocayne JD, Scott J, Shirley R, Liu LI, Glodek A, Kelly J M, Weidman JF, Phillips CA, Spriggs T, Hedblom E, Cotton MD, Utterback TR, Hanna MC, Nguyen DT, Saudek DM, Brandon RC, Fine LD, Fritchman JL, Fuhrmann JL, Geoghagen NSM, Gnehm CL, McDonald LA, Small KV, Fraser C M, Smith HO, Venter JC. 1995. Multidrug resistance protein (*emrB*) homolog-*Haemophilus influenzae* (strain Rd KW20), Science 269:496-512.
 24. Fuerst, E. P. and Vaughn, K. C. 1990. Mechanisms of paraquat resistance, Weed Technology 4:150-156.
 25. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, Exp. Cell Res. 50:151-158.
 26. Gan, J., Yates, S. R., Becker, J. O. and Wang, D. 1998. Surface amendment of fertilizer ammonium thiosulfate to reduce methyl bromide emission from soil, Environ. Sci. Technol. 32:2438~2441.
 27. Griffin, J.D. and M.S. Dibble. 1995. High frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.), Plant Cell Rep. 14:721-724.
 28. Gutteridge, J. M. C. and Halliwell, B. 1982. The roles of superoxide radicals in the degradation of DNA and deoxyribose induced by a copper-phenanthroline complex, Biochem. Pharmacol. 31:2801-2805.

29. Haarstick, A., Kut, O. M. and Heinzle, E. 1996. TiO₂-assisted degradation of environmentally relevant organic compounds in waste water using a novel fluidized bed photoreactor, *Environ. Sci. Technol.* 30:817-824.
30. Hance, R. J. 1987. Decomposition of herbicides in the soil by non-biological chemical processes, *J. Sci. Food Agr.* 18:544-547.
31. Hofmann MM, Stoffel W. 1993. Construction and functional characterization of recombinant fusion proteins of human lipoprotein lipase and apolipoprotein CII, *Eur. J. Biochem.* 237:545-52.
32. Hongo E, Morimyo M, Mita K, Machida I, Hama-Inaba H, Tsuji H, Ichimura S, Noda Y. 1994. The methyl viologen-resistance-encoding gene *smvA* of *Salmonella typhimurium*, *Gene* 148:173-174.
33. Horsch, R. B., Fry, J., Hoffmann, N., Neidermeyer, J., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. 1978. Leaf disc transformation. In *Plant Molecular Biology: Manual*. Gelvin S. B. Ed., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, A5:1-9.
34. Kanazawa, J. 1990. Behavior of herbicides with long-term application to soils, *Skucho* 24:338.
35. Kao SM, Hassan HM. 1985. Biochemical characterization of a paraquat-tolerant mutant of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 260:10487-10481.
36. Kesselman, J. M., Lewis, N. S. and Hoffmann, M. R. 1997. Photoelectrochemical degradation of 4-chlorocatechol at TiO₂ electrodes : Comparison between sorption and photoreactivity, *Environ. Sci. Technol.* 31:2298-2302.
37. Kim, J. -E., Fernandes, E. and Bollag, J. -M. 1997. Enzymatic coupling of the herbicide bentazon with humus monomers and characterization of reaction products, *Environ. Sci. Technol.* 31:2392-2398.
38. Kim, J. -E., Wang, J. -C. and Bollag, J. -M. 1997. Interaction of reactive and inert chemicals in the presence of oxidoreductase: Reaction of the herbicide bentazon and its metabolites with humic monomers, *Biodegradation* 8:387-392.
39. Knight, B. A. G. and Tomlinson, T. E. 1967. The interaction of paraquat

- (1,1'-dimethyl-4,4'-dipyridinium dichloride) with mineral soil, J. Soil Sci. 18:233-243.
40. Kuhlemeier C, Fluhr R, Green PJ, Chua NH. 1987. Sequences in the pea rbcS-3A gene have homology to constitutive mammalian enhancers but function as negative regulatory elements, Genes Dev. 1:247-55.
 41. Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol. 157:105-132.
 42. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227:680-685.
 43. Larkin PJ, Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, Theor. Appl. Genet. 60:197-214.
 44. Larson, R. A., Schlauch, M. B. and Marley, K. A. 1991. Ferric ion promoted photodecomposition of triazines, J. Agric. Food Chem. 39:2057-2062.
 45. Lenke, H. 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil. 2. biologically induced immobilization of the contaminants and full-scale application, Environ. Sci. Technol. 32:1964-1971.
 46. Lomovskaya O, Lewis K. 1992. Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance, Cell Biol. 89:8938-8942.
 47. Mackenzie, W. 1997. Agrochemical service McBride, M. B. 1994. Environmental chemistry of soils pp. 356-363.
 48. Marmur J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, J. Mol. Biol. 3:208-218.
 49. Martin CA, Ziegler LM, and Napoli JL. 1990. Retinoic Acid, Dibutyryl-cAMP, and Differentiation Affect the Expression of Retinoic Acid Receptors in F9 Cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(12):4804-4808.
 50. Mccray, J. E. and Brusseau, M. L. 1998. Cyclodextrin-enhanced in Situ flushing of multiple-component immiscible organic liquid contamination at the

- field scale : mass removal effectiveness, Environ. Sci. Technol. 32:1285-1293.
51. Mccray, J. E. and Brusseau, M. L. 1999. Cyclodextrin-enhanced in Situ flushing of multiple-component immiscible organic liquid contamination at the field scale : analysis of dissolution behavior, Environ. Sci. Technol. 33:89-95.
 52. McMurry L, Petrucci RE Jr, Levy SB. 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad Sci. USA 77:3974-7.
 53. Misra, H. P. and Fridorich, I. 1976. Superoxide dismutase and the oxygen enhancement of radiation lethality, Arch. Biochem. Biophys. 176:577-581.
 54. Morimyo M, Etsuko HH, Hiriko I, Isamu M. 1992. Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity, Nucleic Acids Res. 20:3159-3165.
 55. Morimyo M, Hongo E, Hama-Inaba H, Machida I. 1992. Nucleic Acids Res. 20: 3159-3165.
 56. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant. 25:473-497.
 57. Murray S, Tomson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
 58. Neyfakh AA, Bideneko VE, Chen LB. 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4781-4785.
 59. Ouchterlony O, Nilson LA. 1986. Immunodiffusion and immuno electrophoresis. In Handbook of Experimental Immunology, Blackwell, Oxford. Vol. 1. pp.32.1-32.50.
 60. Paulsen IT, Skurray RA. 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes-an analysis, Gene 124: 1-11.
 61. Pellet DM, Parpernik LA, Kochian LV. 1996. Multiple aluminum-resistance

- mechanisms in wheat, *Plant Physiol.* 112:594-597.
62. Pignatello, J. J. 1992. Dark and photo-assisted Fe³⁺-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide, *Environ. Sci. Technol.*, 26:944-951.
 63. Pignatello, J. J. and Chapa, G. 1994. Degradation of PCBs by ferric ion, hydrogen peroxide and UV light, *Environ. Toxi. and Chem.* 13:423-427.
 64. Pignatello, J. J. and Huang, L. Q. 1993. Degradation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran contaminants in 2,4,5-T by photo-assisted iron catalyzed hydrogen peroxide, *Water Res.* 27:1731-1736.
 65. Pohlenz HD, Boidol W, Schuttke I, Streber WR. 1992. Purification and properties of an *Arthrobacter oxydans* P52 carbamate hydrolase specific for the herbicide phenmedipham and nucleotide sequence of the corresponding gene, *J. Bacteriol.* 174:6600-6607.
 66. Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome, *Mol Microbiol.* 21:77-96.
 67. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. 1977. Nucliotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA, *Nature* 24:265(5596):687-95.
 68. Schmees G, Schneider E. 1998. Domain structure of the ATP-binding-cassette protein MalK of *Salmonella typhimurium* as assessed by coexpressed half molecules and LacK-MalK chimeras, *J. bacteriol.* 180:5299-5305.
 69. Shao ZQ, Behki R. 1995. Cloning of the genes for degradation of the herbicides EPTC (s-Ethyl Dipropylthiocarbamate) and atrazine from *Rhodococcus* sp. Strain TE1, *App. Environ. Microbiol.* 61:2061-2065.
 70. Simmons, K. D., Minard, R. D. and Bollag, J-M. 1994. Oxidative coupling and polymerization of guaiacol, lignin derivative, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52:1356-1360

71. Sun, Y. and Pignatello, J. J. 1993. Photochemical reactions involved in the total mineralization of 2,4-D by Fe³⁺/H₂O₂/UV, Environ. Sci. Technol. 27:304-310.
72. Tan, K. H. 1977. Infrared spectra of humic acids and fulvic acids, containing silica, metal ions and hygroscopic moisture, Soil Sci. 123:235-240.
73. Tatsumi, K., Freyer, A. and Bollag, J-M. 1994. Enzymatic coupling of chloroaniline with syringic acid, vanillic acid and protocatechuic acid, Soil Biol. Biochem. 26:735-742.
74. Thomas, P. S. 1983. hybridization of denatured RNA transfer of dotted nitrocellulose paper, Methods in Enzymology 100:255-266.
75. Tomlin, C. D. S. 1997. The pesticide manual, 11th ed., British crop protection council, UK, pp. 923-925.
76. Torimoto, T. Ito, S. and Kuwabata, S., Yoneyama, H., 1996. Effects of adsorbents used as supports for titanium dioxide loading on photocatalytic degradation of propyzamide Environ, Sci. Technol. 30:1275-1281.
77. Tucker, B. V. and Pack, D. E. and Ospenson, J. M. 1967. Adsorption of bipyridylum herbicides in soil, J. Sci. Food Agr. 15:1005-1008.
78. Van der Valk, P., F. Ruis, A.M. Tettelaar-Schrier and C.M. Van de Velde. 1995. Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass. The effect of benzyladenine, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 141:589-595.
79. Vasil, V. and I.K. Vasil. 1984. Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of *Gramineae*, pp.36-42, In Vasil, I. K. (ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1. Academic Press, Orlando, Florida.
80. Wang, Q., Gan, J., Papiernik, S. K. and Yates, S. R. 2000. Transformation and detoxification of halogenated fumigants by ammonium thiosulfate, Environ. Sci. Technol. 34:3717-3721.
81. Wang, Q., Gan, J., Papiernik, S. K. and Yates, S. R. 2001. Isomeric effects on thiosulfate transformation and detoxification of 1,3-dichloropropene, Environ,

- Toxicol. Chem. 20:960-964.
82. Wang, X. and Brusseau, M. L. 1995. Cyclopentanol-enhanced solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by cyclodextrins, Environ. Sci. Technol. 29:2346~2351.
 83. Weber, J. B., Perry, P. W. and Upchurch, R. P. 1965. The influence of temperature and time on adsorption of paraquat, diquat, 2,4-D and prometone by clay, charcoal and an anion-exchange resin, Soil Science Society proceedings 29:678-687.
 84. Yamaguchi A, Akasaka T, Kimura T, Sakai T, Adachi Y, Sawai T. 1993. Biochemistry 32:5698-5704.
 85. Yerushalmi H, Lebendiker M, Schuldiner S. 1995. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents, J. Biol. Chem. 270:6856-6863.
 86. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. 1990 Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones, J. Bacteriol. 172:6942-6949.
 87. 권정욱, 이재구, 1999. Micro-ecosystem 중 bipyridylum 제초제 paraquat 토양 잔류물의 행적, 한국농약과학회지 3:66-77.
 88. 농약공업협회, 1997. 농약연보, pp 200-204.
 89. 이규승, 1996 '96 국내 과수재배 지역의 농약잔류량 조사 - 토양 및 작물의 paraquat 잔류량 조사, 한국환경농학회 연구조사용역 사업보고서, 한국환경농학회.
 90. 이석준, 김병하, 김장억, 1998. 제초제 paraquat의 토양중 흡·탈착 특성, 한국농약과학회지 2:70-78.
 91. 이영득, 1998. Paraquat에 의한 지하수 오염가능성 조사연구, 농약공업협회 연구조사용역 사업보고서, 농약공업협회.
 92. 전재철, 1998 '97 국내 과수재배 지역의 농약잔류량 조사 - 토양중 paraquat의 잔류량 조사, 시용 paraquat에 의한 후작물 영향시험, 농약공업협회 연구조사용역 사업보고서, 농약공업협회.

93. 전재철, 김성은, 박남일, 임성진, 1998. 우리 나라 과수원 토양의 paraquat 잔류와 흡착능, 한국농약과학회지 2:90-95.