

## 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. BY4) 카드뮴 저항성 캘러스로부터 식물체 재생과 단백질 분석

오승철 · 소웅영 · 조덕이<sup>1</sup> · 양덕춘<sup>2\*</sup>

전북대학교 생물과학부, <sup>1</sup>우석대학교 생물학과, <sup>2</sup>한국인삼연초연구원

### Plant Regeneration and Protein Analysis from Cadmium Resistant Callus of Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. BY4)

OH, Seung-Cheol · SOH, Woong-Young · CHO, Duck-Yee<sup>1</sup> · YANG, Deok-Chun<sup>2</sup>

Department of Biological Science, Chonbuk National University, Chonju, 560-756, Korea

<sup>1</sup>Department of Biology, Woosuk University Chonbuk, 565-800, Korea

<sup>2</sup>Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

**ABSTRACT** Calli were induced from diploid and haploid tobacco after 4 weeks and maintained on MS medium with combination of 2.0 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP and 2.0 mg/L kinetin. Suspension cells were screened through 65  $\mu$ m-nylon mesh and 100  $\mu$ m-mesh, then they were smeared on selection medium combined with cadmium and PFP by using the low melting agarose of 0.8%. After 30days smeared cultures of the medium the cell was treated with 500  $\mu$ M and 1000  $\mu$ M to select the resistant cell line were selected. Plant regeneration was induced from the selected cell lines on medium with 0.5, 1.5, 2.0 mg/L BAP and on media with combination of auxin and BAP under 500  $\mu$ M and 1000  $\mu$ M cadmium. At this time, plant regeneration was achieved on cadmium free medium. In case of haploid, occurred from the cell line which is selected in medium with cadmium and PFP. In case of diploid regeneration occurred is in the medium with cadmium alone. The plantlet regenerated from cadmium resistant calli grew well in cadmium 500  $\mu$ M. Protein pattern of leaf, root, stem of regenerated plants was analyzed. The quantum was 6.5188 ug/mg.fr.wt in the leaf of plant, 5.3611 ug/mg.fr.wt in the stem, 3.0213 ug/mg.fr.wt in the root. On the other hand, 5.9652 ug/mg.fr.wt. in the leaf of control, 3.5974 ug/mg.fr.wt in the stem of the control, 4.3766 ug/mg.fr.wt. in the root of the control. The one dimension bends regenerated from cadmium resistant calli resistant to cadmium in leaf were 49 involving 198.7KD etc. Disappeared were 4 involving 160.5KD etc. The protein bends were combined were 3 involving 83.4KD etc. The bends resistant to cadmium stress in stem were 41 involving 4.3KD etc. Disappeared were 5 involving 114.8KD etc. The protein bends combined were 6 involving 128.7KD etc. The bends which had the resistance to cadmium stress in root is 27 in involving 166.9KD etc. The bends which disappeared were 198.7KD etc. There were 5 involving 83.4KD etc.

**Key words:** Diploid, haploid, p-fluorophenylalanine, stress

\*Corresponding author. Tel 042-866-5434

E-mail dcyang@gtr.kgtri.re.kr

## 서 론

식물은 토양에 정착되어 살기 때문에 환경에 존재하는 다양한 금속에 의해서 영향받기 쉬운 것으로 알려져 있으며 중금속은 생물이 필요로 하는 여러 효소 중에서 특히 중금속에 민감한 효소의 활성을 억제하여 식물을 죽게 한다 (Miyasaka et al. 1989; Zhang and Taylor 1989; Kneer and Meinhart 1991). 이러한 중금속들 중에서 카드뮴은 식물생장에 필요하지 않으며 매우 유독한 것으로 알려져 있다 (Cutler and Rains 1974; Sugiyama 1991).

식물이 중금속에 노출되었을 경우 세포내에 도입된 중금속을 흡착 (chelation)하는 단백질이 생성되는데 이를 phytochelatin이라 한다. Phytochelatin은 일반적인 구조가 poly-[*r*-glutamylcysteinnyl] glycines이고 중금속을 chelate 한 후 액포내로 이동된다 (Huang and Goldsbrough 1988; Jackson et al. 1987, 1990).

Somashekaraiah (1992) 등은 고등식물에서 광합성과 호흡은 납이나 알루미늄과 같은 중금속에 매우 민감하며, 카드뮴은 protochlorophyll reductase와 반응하여 chlorophyll과 5-aminolevulinic acid (ALA)를 합성하지 못한다고 하였다. Vallee와 Ulmer (1972)는 카드뮴이  $Ca^{++}$ ,  $Na^+$ 과 반응하여 구조적으로 안정을 찾는 인지질과도 반응하여 여러 생체막에 독성효과를 나타내기도 하고, RNA와 DNA에도 결합하여 RNA와 DNA의 입체적, 구조적 변형을 유도한다고 하였다. 때문에 식물과 식물세포에서 금속에 저항성을 나타내는 기작에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Jackson 1990).

중금속저항성을 나타내는 몇몇의 중요한 측면이 밝혀졌지만, 저항성에 대한 명확한 기작이 결정된 모델은 아직 보고된 바 없다. 만약 이에 대한 연구가 확립된다면 모델 생물에 필요한 자료가 제공되어, 인간건강과 환경에 대한 공업활동의 영향을 예측할 수 있으며, 이미 오염된 장소를 안정시키며 다른 불량환경에도 응용범위가 확대되리라 사료된다.

따라서 본 실험에서는 이러한 중금속에 대한 식물의 적응 기작을 이해하기 위한 기초자료를 제공하고자 담배의 캘러스를 재료로 카드뮴, *p*-fluorophenylalanine을 단독, 조합처리하여 형성된 각각의 저항성 세포주로부터 카드뮴이 고농도로 포함된 경화배지에서 경화시켰다. 경화 후 선발된 세포주로부터 식물체 재생을 유도하였으며, 유도된 식물체를 각 조직 (잎, 줄기, 뿌리)별로 분류한 후 단백질 유형을 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 실험의 식물재료는 온실내에서 유지되고 있는 담배

(*Nicotiana tabacum* L. cv. BY4)와 약배양으로부터 유도된 반수체의 잎절편으로부터 유도된 캘러스를 사용하였다.

### 담배캘러스의 유도 및 증식

온실내에서 유지되고 있는 이배체와 식물체의 발달 정도가 다른 화아를 각각 선별하여 활성탄 (3 g/L)이 첨가된 Nakata 배지 (Nakata and Kurihara 1972)에 치상한 후, 온도  $25 \pm 1^\circ C$ , 조도 1,900 lux, 광주기는 16/8h의 조건에서 배양하였다. 약배양을 통해 유도된 반수체식물의 증식은 유리화현상을 제거하기 위해 1~3개의 소식물체로 나누어 발근배지로 옮겨주어 증식시켰다. 증식시킨 후 식물체의 근단으로부터 염색체를 관찰하였던 바 염색체가 반감되어 있음을 확인할 수 있었다. 주맥을 제거한 잎절편을 MS기본배지에 sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가하고 성장조절물질인 2,4-D를 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L의 농도로 단독처리하였고 pH 5.8로 맞춘 배지에 치상하여 온도  $25 \pm 1^\circ C$ , 조도 1,900 lux, 광주기는 16/8h의 조건에서 캘러스를 유도하였다. 그 후 형성된 캘러스를 식물체 재생에 미치는 2,4-D의 영향을 감소시키고자 BAP와 kinetin을 조합처리 하여 계대배양을 실시하였으며, 현탁배양은 캘러스를 1,000  $\mu m$  망에 통과시켜 세포피의 크기를 일정하게 한 후 성장조절물질은 계대배양과 같은 동일조건으로 처리하였다. 배양조건으로는, shaking incubator에서 25 rpm, 온도  $25 \pm 1^\circ C$ 로 배양하였다.

### 저항성 세포주선발을 위한 선발배지 제조

저항성세포주 선발을 위한 선발배지로는 2.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 첨가된 MS배지를 pH 5.8로 맞춘 후 카드뮴은 0~2,000  $\mu M$ 의 농도로 첨가하였으며, *p*-fluorophenylalanine은 0~200  $\mu M$ 의 필요농도로 첨가한 후 pH를 조절하고 습열멸균을 실시하였다. 카드뮴과 *p*-fluorophenylalanine 혼합 선발배지는 위와 동일방법을 사용하였으며 습열멸균 후에 1회용 페트리디쉬에 25 mL씩 분주한 후 low melting agarose (LMA)를 사용하여 2 mL씩 도말하였다.

### 저항성 세포피 (colony : clump)선발

도말배양 30일 후 형성된 colony는 카드뮴 단독처리에서 이배체인 경우 300  $\mu M$ 이었고, 반수체의 경우 200  $\mu M$ 이었다. 그리고 PFP 단독처리시에는 이배체인 경우 100  $\mu M$ , 반수체인 경우 50  $\mu M$ 이었다. 조합 처리된 처리구에서 선발된 세포주에 있어서 이배체인 경우에 있어서는 카드뮴 200  $\mu M$ 과 PFP 50  $\mu M$ 의 조합처리구에서, 반수체인 경우 카드뮴 100  $\mu M$ 과 PFP 50  $\mu M$ 의 조합처리구에서 저항성 세포주를 선발하였다. 선발된 colony를 카드뮴이 고농도 (500~2,000  $\mu M$ )로 첨가된 배지에 옮긴 후 30~40일간 경화시켰다. 경화 후 세포

의 증식이 비교적 양호한 500  $\mu\text{M}$ 의 처리구를 선발하였다.

#### 선발된 카드뮴 저항성 캘러스로부터 식물체재생유도

카드뮴이 고농도 (500~2,000  $\mu\text{M}$ )로 첨가된 배지에서 경화된 세포주를 가지고 BAP 단독, BAP와 IAA, NAA, IAA 조합처리, 그리고 카드뮴이 첨가된 BAP 단독, BAP와 IAA, NAA가 조합처리된 MS배지에 치상하여 식물체를 유도하고자 하였다.

#### 단백질 비교분석

기내에서 증식된 반수체와 카드뮴 스트레스로부터 재생된 식물체를 잎, 줄기, 뿌리로 분리한 후 800 mg씩 넣고 액체질소로 동결시켜서 유발과 유봉으로 균질화 시킨 후 O'Farrell buffer (O'Farrell 1975)를 첨가하여 실온에서 30분간 방치하였다. 이것을 15,000 rpm으로 10분간 원심분리시켜 상등액을 취한 후 Bradford 방법 (1977)으로 단백질함량을 정량하였다. 또한 SDS-PAGE를 위하여 Laemmli buffer (Laemmli 1970), 80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol)를 넣어서 3분간 100°C에서 SDS 처리하였다. 분리겔은 12% acrylamide 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 1% sodium dodecyl sulfate, 1.5% ammonium persulfate (AMPS), TEMED를 중합하여 만들었다. 농축겔은 4% acrylamide 80 mM Tris-HCl, 1% SDS, 1.5% AMPS, TEMED로 중합시킨

후 시료를 각각 5  $\mu\text{g}$  채취하여 영동에 사용하였다. Gel calibration은 저분자 marker를 사용하였고 전기영동이 끝난 SDS-PAGE를 10% TCA로 20분간 단백질을 고정시킨 후 은염색법으로 염색하였다 (Figure. 1).

## 결과 및 고찰

### 카드뮴과 PFP처리시 저항성세포주 선발

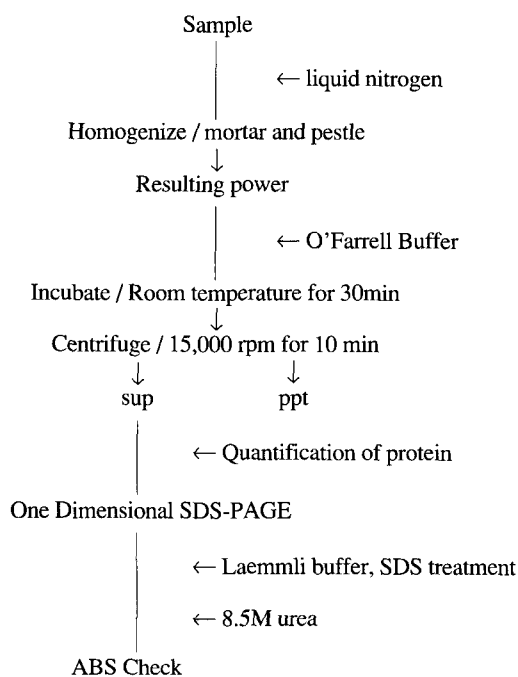
카드뮴 처리시 이배체는 세포의 성장에 있어서 최저저해농도 (MIC; Minimum Inhibition Concentration)는 300  $\mu\text{M}$ 과 PFP는 100  $\mu\text{M}$ 이었으며, 그 이상 농도처리구에서는 선발되지 않았으며, 반수체 역시 카드뮴 처리시 최저저해농도는 200  $\mu\text{M}$ 과 PFP는 50  $\mu\text{M}$ 이었으며, 마찬가지로 그 이상의 고농도에서는 캘러스가 형성되지 않았다. 이들 카드뮴과 PFP를 조합처리하여 형성된 저항성 세포주는 이배체는  $\text{Cd}^{++}$  200  $\mu\text{M}$  + PFP 50  $\mu\text{M}$  처리구에서, 반수체는  $\text{Cd}^{++}$  100  $\mu\text{M}$  + PFP 50  $\mu\text{M}$  처리구에서 선발된 세포주를 선발하였다. 이때 각 처리구에서 선발된 세포주를 각각 카드뮴 500, 1,000, 2,000  $\mu\text{M}$ 의 농도로 옮겨주어 카드뮴저항성세포주를 선발하였고 그 특성을 조사하였을 때, 카드뮴 저항성을 띤 반수체 및 이배체유래 캘러스의 경우에는 각각 카드뮴의 농도가 증가할수록 생중량은 감소하였으나, 건조중량은 증가하였다.

### 식물체유도 및 증식

카드뮴과 PFP가 단독 내지 조합처리 된 선발배지에서 선발된 캘러스를 식물체재생 유도배지로 옮겨졌을 때, 이배체의 경우에는 반수체에 비해서 식물체재생이 낮았으며 반수체의 경우에는 카드뮴이 첨가된 배지에서는 식물체의 재생은 전혀 일어나지 않았다.

이배체인 경우에 있어서 PFP 100  $\mu\text{M}$ 에서 선발된 세포주를 카드뮴이 고농도인 500  $\mu\text{M}$ 에서 경화시킨 후 식물체재생을 유도하였고,  $\text{Cd}^{++}$  300  $\mu\text{M}$ , PFP 50  $\mu\text{M}$ 과  $\text{Cd}^{++}$  200  $\mu\text{M}$ 이 조합처리된 것을 같은 방법으로 실시하였다. 이때 카드뮴이 첨가된 처리구에서는 전혀 식물체재생이 일어나지 않았지만 카드뮴이 첨가 되지 않은 BAP 1.5 mg/L, 2.0 mg/L 그리고 BAP 1.5 mg/L와 NAA 0.5 mg/L의 조합처리구에서는 식물체재생이 일어났다.  $\text{Cd}^{++}$  300  $\mu\text{M}$ 에서 선발된 것을 세포가 스트레스는 외부적 환경요인에 의해서인지 어느 정도 적응한 후 식물체재생이 일어났으나 PFP가 첨가된 처리구에서의 것은 전혀 일어나지 않았다 (Table 1).

PFP 100  $\mu\text{M}$  처리구에서 선발되어 증식된 캘러스를  $\text{Cd}^{++}$  500  $\mu\text{M}$ 과 BAP 그리고 IAA가 첨가된 조건에서는 대체로 연두색을 나타내었으나  $\text{Cd}^{++}$  1,000  $\mu\text{M}$ 이 첨가된 BAP와 IAA가 첨가된 처리구에서는 세포의 생장이 저조하였고 색깔도



**Figure 1.** Schematic representation of sample extraction method for one dimensional electrophoresis and quantification of protein.

**Table 1.** Various color of cadmium resistance callus\* cultured on the regeneration medium.

Cd <sup>++</sup> conc. ( $\mu$ M)	Plant growth regulators (mg/L)		Selected Cell Lines			
			P100	Cd300	P50	Cd200
-	BAP 0.5	-	G	Gr	G	
-	BAP 1.5	-	GrG	G(2) <sup>a</sup>	YG	
-	BAP 2.0	-	-	G(17)	G	
500	BAP 1.5	NAA 0.5	-	G(7)	-	
500	BAP 0.5	-	G	-	-	
500	BAP 1.5	-	G	GrG	GrG	
500	BAP 0.1	IAA 0.01	Gr	GrG	Gr	
500	BAP 0.5	IAA 0.05	YG	G	G	
500	BAP 1.5	IAA 0.15	YG	YG	GrG	
500	BAP 1.5	NAA 0.5	-	GrG	YG	
1,000	BAP 0.5	-	PY	Y	-	
1,000	BAP 1.5	-	PY	Y	Y	
1,000	BAP 0.1	IAA 0.01	YG	YG	-	
1,000	BAP 0.5	IAA 0.05	YG	YG	-	
1,000	BAP 1.5	IAA 0.15	Y	Y	-	
1,000	BAP 1.5	NAA 0.5	-	Gr	GG	

Gr : Gray GrG : Gray Green G : Green

YG : Yellow Green Y : Yellow PY : Pale Yellow

a : Number of shoots derived from callus after 6 weeks

\* : callus was derived from leaf of diploid plant.

연두색 계통으로 식물체 재생률은 대체로 낮았다. 그러나 Cd<sup>++</sup> 1,000  $\mu$ M과 BAP 단독처리된 처리구에서는 세포가 생장을 하지 않고 거의가 죽었으며, 세포의 색깔은 무색에 가까웠다.

Cd<sup>++</sup> 300  $\mu$ M 처리구에서 선발된 것은 카드뮴이 첨가되지 않은 조건에서는 비교적 양호한 식물체재생이 일어났다. 그리고 정상 식물체에서 유도된 캘러스를 식물체재생을 유도했을 때와 마찬가지로 BAP 2.0 mg/L에서와 비슷한 조건으로 이루어졌다. Cd<sup>++</sup> 500  $\mu$ M과 BAP 단독, BAP와 IAA를 조합처리한 처리구에서 형성된 색깔은 대체로 녹색이었으나 조건에 따라서는 회색빛이 침적된 녹색으로 나타났으며 지속적인 관찰결과 거의 진한 회색으로 되어 생장이 정지되었다. 그리고 Cd<sup>++</sup> 1,000  $\mu$ M과 BAP 단독, BAP와 IAA를 조합처리한 처리구에서 형성된 캘러스는 생장이 저조하며 색깔은 대체로 옅은 연두색에서 노란색을 나타내었다. 그러나 BAP 1.5 mg/L와 NAA 0.5 mg/L에서는 회색빛 녹색을 나타내기도 하였으나 이 처리구 역시 생장은 저조하였다.

카드뮴과 PFP가 조합처리된 처리구에서 선발된 캘러스 역시 카드뮴이 첨가되지 않은 BAP 단독에서나 Cd<sup>++</sup> 500  $\mu$ M, 1,000  $\mu$ M 그리고 BAP와 IAA가 조합처리된 처리구에서는 식물체재생이 일어나지 않았다. 이때의 캘러스의 색깔은 대체로 Cd<sup>++</sup> 500  $\mu$ M의 경우에 있어서는 대체로 어두운 녹색으로 회색빛이 침적되는 경우를 볼 수 있었으나, Cd<sup>++</sup> 1,000  $\mu$ M 첨가된 처리구에서는 연한 노란색으로 세포의 생장이 정지되

는 경우를 볼 수 있었다. 반수체인 경우에 있어서 PFP 50  $\mu$ M에서 선발된 세포주를 카드뮴이 고농도인 500  $\mu$ M에서 경화시킨 후 식물체재생 조건으로 옮겼고 Cd<sup>++</sup> 200  $\mu$ M, PFP 50  $\mu$ M과 Cd<sup>++</sup> 100  $\mu$ M이 조합처리된 것을 같은 방법으로 실시하였다. 이때 카드뮴이 첨가된 처리구에서는 전혀 식물체재생이 일어나지 않았지만 카드뮴이 첨가 되지 않은 BAP 0.5, 1.5, 2.0 mg/L 그리고 BAP 1.5 mg/L와 NAA 0.5 mg/L의 조합 처리구에서 식물체재생이 일어났다. Cd<sup>++</sup> 200  $\mu$ M에서 선발된 것은 이배체와는 달리 식물체재생이 일어나지 않았고 회색빛 녹색으로 회색빛이 침적된 부분이 많았다.

반수체는 PFP 50  $\mu$ M 처리구에서 선발되어 증식된 캘러스를 BAP 단독, BAP와 NAA 조합처리구에서는 대체로 식물체의 식물체재생이 일어났으며 녹색의 캘러스가 형성이 된다. 그리고 Cd<sup>++</sup> 500  $\mu$ M, 1,000  $\mu$ M과 BAP단독, BAP와 IAA, NAA가 조합처리된 처리구에서는 생장이 대체로 저조하였으며 회색빛 녹색을 나타내고 나중에는 생장이 정지되는 경우를 나타내었다.

Cd<sup>++</sup> 100  $\mu$ M 처리구에서 선발되어 증식된 캘러스는 회색빛 녹색을 나타내거나, 거의 생장을 하지 않았다. Cd<sup>++</sup> 500  $\mu$ M과 BAP 단독, BAP와 IAA를 조합처리한 처리구에서 형성된 색깔은 대체로 녹색과 회색빛 녹색을 나타내었고, 마찬가지로 Cd<sup>++</sup> 1,000  $\mu$ M과 BAP 단독, BAP와 IAA를 조합처리한 처리구에서 형성된 캘러스도 생장이 저조하며 색깔은 거의 같은 색을 나타내었으며 이 처리구 역시 생장은 저조하였다.

카드뮴과 PFP가 조합처리된 처리구에서 선발된 캘러스는 카드뮴이 첨가 되지 않은 조건에서는 비교적 양호한 식물체재생이 일어났다. 그리고 정상 식물체에서 유도된 캘러스를 식물체로 재생시켰을 경우에서와 마찬가지로 BAP 2.0 mg/L에서와 비슷한 조건으로 이루어졌다.

Cd<sup>++</sup> 500  $\mu$ M, 1,000  $\mu$ M 그리고 BAP와 IAA가 조합처리된 처리구에서는 식물체재생이 일어나지 않았다. 이 때의 캘러스의 색깔은 대체로 Cd<sup>++</sup> 500  $\mu$ M의 경우에 있어서는 대체로 어두운 회색빛 녹색이 나타나는 경우를 볼 수 있었고, Cd<sup>++</sup> 1,000  $\mu$ M이 첨가된 처리구에서는 연두색과 회색빛 녹색이 나타나며 세포의 생장이 정지되는 경우를 볼 수 있었다 (Table 2).

이렇게 재생된 식물체들은 대다수가 유리화 현상을 나타내었다. 이중에서 실험목적상 육종에 유리한 반수체유래 캘러스로부터 카드뮴과 *p*-fluorophenylalanine가 조합처리된 처리구에서 선발된 캘러스를 본 실험에 사용하였다. 이에 유리화 현상이 일어난 소식물체들을 하나하나 분리하여 (Figure. 2A) 발근배지에 옮겨 성장을 시켰던 바 (Figure. 2B) 20일 이후에는 정상식물체로 자라는 것을 관찰할 수가 있었다 (Figure. 2C). 그리고 육안으로 살펴보면 정상 식물체에서는 잎과 줄기에 잔털이 많이 있었음을 관찰할 수가 있었으나 (Figure. 2D) 식물체재생된 식물체에서는 그러한 경향이 저조

**Table 2.** Various color of cadmium resistance callus\* cultured on the regeneration medium.

Cd <sup>++</sup> conc. ( $\mu$ M)	Plant growth regulators (mg/L)		Selected Cell Lines		
			P50	Cd200	P50 Cd100
-	BAP 0.5	-	G(14) <sup>a</sup>	Gr	G(14)
-	BAP 1.5	-	Y	Gr	YG
-	BAP 2.0	-	G(2)	-	G(27)
500	BAP 1.5	NAA 0.5	G	-	-
500	BAP 0.5	-	G	G	G
500	BAP 1.5	-	Y	G	YG
500	BAP 0.1	IAA 0.01	Gr	GrG	-
500	BAP 0.5	IAA 0.05	Gr	GrG	-
500	BAP 1.5	IAA 0.15	Gr	GrG	Gr
500	BAP 1.5	NAA 0.5	GrG	-	-
1,000	BAP 0.5	-	-	PY	-
1,000	BAP 1.5	-	YG	YG	YG
1,000	BAP 0.1	IAA 0.01	GrG	GrG	GrG
1,000	BAP 0.5	IAA 0.05	G	GrG	G
1,000	BAP 1.5	IAA 0.15	-	YG	-
1,000	BAP 1.5	NAA 0.5	GrG	-	-

Gr : Gray GrG : Gray Green G : Green

YG : Yellow Green Y : Yellow PY : Pale Yellow

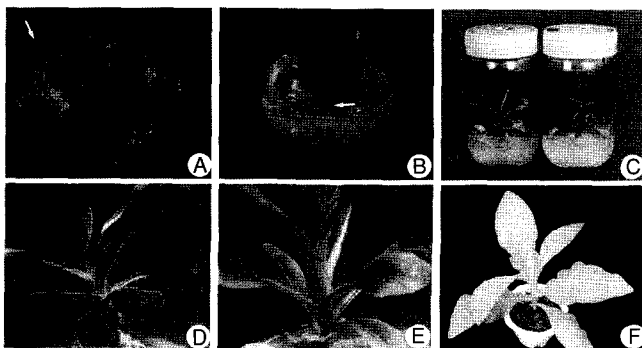
a : Number of shoots derived from callus after 6 weeks

\* : callus was derived from leaf of diploid plant.

하였다 (Figure. 2E). 또한 정상식물체인 경우에 기내에서 많은 시간 키우면 배지의 고갈 등으로 노화가 일어나는데 식물체 재생된 식물체에서는 배지의 고갈 없이도 빠른 노화가 일어남을 알 수 있었다. 기내에서 성장이 좋은 처리구의 식물체를 선별하여 포트에 옮겨 심었다. 이후로 정상적으로 성장하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure. 2F).

### 단백질 비교분석

카드뮴과 PFP에 대해 스트레스를 받은 반수체 식물과 대조구로서 스트레스를 받지 않은 반수체 식물의 잎, 줄기, 뿌리를 분리하여 단백질유형을 비교 분석하였다. 수용성 단백질의 함량은 Bradford 방법으로 정량하였고, 그 함량은 재생된 식

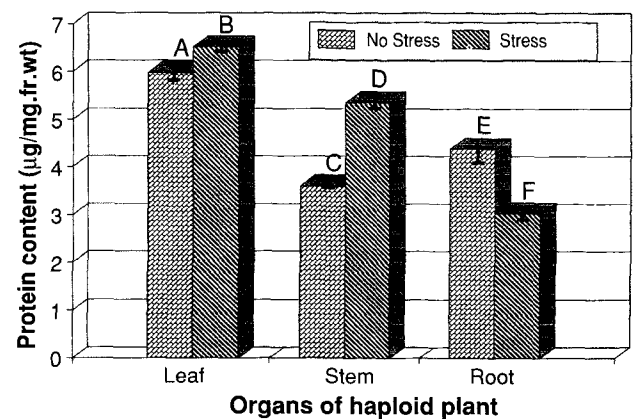


**Figure 2.** Plant regeneration and acclimatization from cadmium resistant calli. A; Plant regeneration from cadmium resistant calli, B, C; plantlet on rooting medium, D; Normal diploid plantlet, E; Haploid plant, F; Plant acclimatized in pot.

물체의 잎, 줄기는 대조구보다는 높았으나 뿌리에 있어서는 낮은 경향을 나타내었다. 단백질 밴드분석은 Laemmli 방법으로 일차원 SDS-PAGE를 수행하였던 결과 단백질 밴드는 공통단백질밴드, 사라진 밴드, 합성된 밴드가 다양하게 나타났다.

수용성 단백질의 함량은 스트레스를 받은 식물체의 잎에서는 6.5188  $\mu$ g/mg.fr.wt., 줄기에서는 5.3611  $\mu$ g/mg.fr.wt.로 대조구의 잎 5.9652  $\mu$ g/mg.fr.wt., 줄기 3.5974  $\mu$ g/mg.fr.wt.보다 높았다. 스트레스를 받아 재생된 식물체의 뿌리에서 3.0213  $\mu$ g/mg.fr.wt.로 대조구인 뿌리에서 4.3766  $\mu$ g/mg.fr.wt. 보다는 낮았다 (Figure 3). 잎에서의 단백질 밴드는 카드뮴 스트레스에 대하여 내성이 있는 것의 공통 단백질 밴드는 198.7 KD 등 49개가 나타났다. 스트레스로 인하여 사라진 밴드는 160.5 KD 등 4개, 합성된 단백질 밴드는 83.4 KD 등 3개이었다. 줄기에서 단백질 밴드는 카드뮴 스트레스에 대하여 내성이 있는 것의 공통 단백질 밴드는 43 KD 등 41개가 나타났고, 사라진 밴드는 114.8 KD 등 5개이었다. 또한 합성되어진 단백질 밴드는 128.7 KD 등 6개가 나타났다. 뿌리에서 단백질 밴드는 카드뮴 스트레스에 대하여 내성이 있는 것의 공통 단백질 밴드는 166.9 KD 등 27개, 사라진 밴드는 198.7 KD 이었고, 83.4 KD 등 5개의 단백질 밴드가 나타났다 (Figure 4).

카드뮴과 *p*-fluorophenylalanine를 단독, 조합처리하여 생육최저해농도 (MIC)에서 저항성 세포주를 선발하였다. 선발된 세포주를 가지고 고농도의 카드뮴이 처리된 선발배지에서 경화시킨 후 세포증식이 비교적 양호한 각각 500  $\mu$ M 처리구의 것으로부터 식물체재생이 유도되었다. 식물체재생은 카드뮴이 첨가되지 않은 처리구에서 일어났으며, 이배체인 경우에는 카드뮴 단독처리시 선발된 세포주에서, 반수체인 경우에는 카드뮴과 PFP 조합처리시 선발된 세포주에서 식물체재생이 일어났다. Choi와 Lee (1987)은 제초제인 glyphosate의 저항성 세포주를 선발, Kim과 Chae는 담배의 역병 저항성 세포주를 선발하여 식물체재생을 보고하였으나 대부분 캘러스 수준에서 선발되고 있고 완전한 식물체재생에 대한 보고는 미약한 실정이다.



**Figure 3.** Comparison of protein content between leaf, stem and root of stressed plant and normal plant.

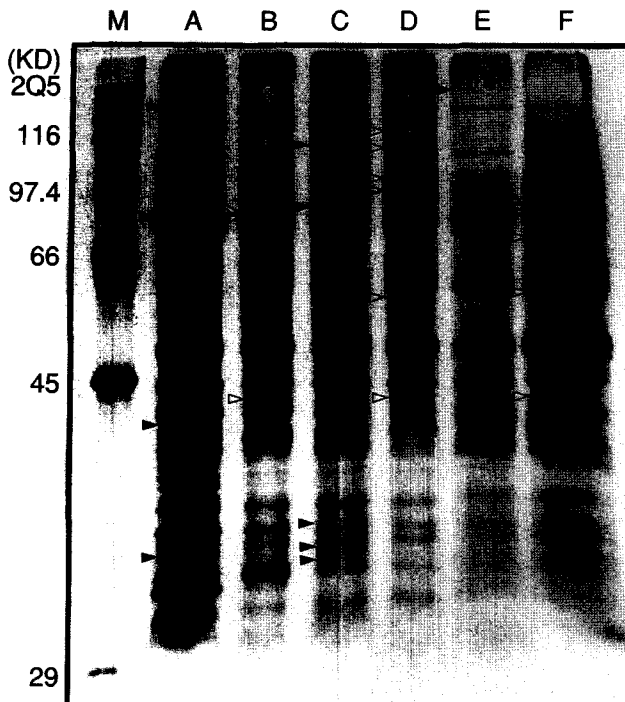


Figure 4. SDS-PAGE electrophoretic pattern of protein extract various tissue. M; Marker, A, C, E; leaf, stem and root of normal plant, B, D, F; leaf, stem and root of stressed plant.

재생된 식물체의 외부 형태를 살펴보면 스트레스를 받지 않은 식물체보다는 잎의 색깔이 옅었으며, 뿌리는 가늘고 연약했다. 재생된 식물체로부터 단백질 유형을 비교분석하였던 바, 카드뮴에 스트레스를 받아 재생된 식물체의 잎과 줄기에서는 스트레스를 받지 않은 식물체보다 수용성 단백질의 함량은 높았으나 뿌리에서는 반대의 경향을 나타내었다. 단백질 유형에서는 스트레스를 받은 식물체의 잎에서 83.4 KD 등 3개, 줄기에서는 128.7 KD 등 6개, 뿌리에서는 83.4 KD 등 5개의 단백질이 나타났음을 알 수 있었다. 이렇게 카드뮴 스트레스에 의해 형성된 단백질은 대조구로 사용한 반수체 식물과는 차이가 있음을 알 수 있었으며 이러한 결과는 Gupta와 Goldsbrough (1990)의 보고와 일치하였다. 이들은 카드뮴 처리시 몇개의 단백질 합성을 감소시켰으며, 또한 새로운 단백질이 합성된 것을 보고하였다. 이렇게 카드뮴의 스트레스로부터 유도된 단백질의 기능은 알려지지 않았으며, 이러한 단백질의 변화로 생리적으로 변화가 생겼음을 알 수 있었다. 앞으로 이러한 연구가 수행되어야 할 것이며, 앞으로 이러한 선발 방법으로 재생된 식물체를 야외에서 순화시켜 변이체 식물과도 비교해야 할 것으로 사료된다. 또한 Chaleff와 Carlson (1975)은 아미노산 유사체에 의하여 2차 대사산물이 증가하는데 이러한 것들은 특수한 유리아미노산의 축적과 관련되어 단백질과 아미노산의 비율의 변화에 관계하여 리신을 과잉생산하는 벼 세포주에서는 리신의 함량이 높음을 보고하였다. 그러나 Reish (1981)은 엘퍼퍼에서는 메티오닌을 과잉 생산하는 세포계가 단백질에서 메티오닌과 다른 아미노산에 비

이 없었다. 비록 몇몇의 세포주에서는 단백질의 함량이 증가되었으나 모든 식물체에서는 적용되지 않고 있다.

카드뮴과 *p*-fluorophenylalanine의 스트레스에 의하여 유도된 식물체는 각 조직간에도 단백질 밴드와 외부형태의 차이점이 있었다. 앞으로 이러한 연구는 새로운 생리, 생화학적 기술을 바탕으로 깊이 수행되어야 하며, 이러한 방법은 돌연변이 선발 및 응용범위를 확대시킬 수 있다고 사료된다.

적 요

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. BY4)의 약을 Nakata배지에 치상하여 반수체식물을 유도하였고, 반수체와 이배체 식물의 잎절편으로부터 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지에서 캘러스를 유도하였다. 이배체와 반수체의 캘러스를 배양 4주 후 2.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP, 2.0 mg/L Kinetin이 조합 처리된 MS기본배지에서 계대배양 및 현탁배양을 실시하였다. 현탁배양된 세포들을 100 μm와 65 μm의 나일론 망으로 걸러서 0.8% low melting agarose를 사용하여 카드뮴과 PFP가 조합된 선발배지에 도말하였다. 도말 배양 30일 후 형성된 저항성 세포주를 선발하여 경화시키기 위해 카드뮴을 500 μM과 1,000 μM을 처리한 다음 500 μM에서 세포주를 선발하였다. 선발된 세포주를 0.5, 1.5, 2.0 mg/L BAP 단독 및 500 μM과 1,000 μM의 카드뮴이 첨가된 BAP와 auxin의 조합처리구에서 식물체 재생을 유도하였다. 이때 식물체 재생은 카드뮴이 첨가되지 않은 처리구에서 일어났으며, 이배체인 경우에는 카드뮴 단독처리시 선발된 세포주에서, 반수체인 경우에는 카드뮴과 PFP 조합처리시 선발된 세포주에서 식물체 재생이 일어났다. 세포의 생장이 왕성한 카드뮴 500 μM의 것을 선발하여 식물체를 재생시켰고, 재생된 식물체의 잎, 줄기 및 뿌리의 단백질 유형을 분석하였다. 대조구로서는 스트레스를 받지 아니한 식물체를 사용하였다.

Bradford방법으로 정량하였고, 그 함량은 재생된 식물체의 잎에서 6.5188 μg/mg.fr.wt., 줄기에서 5.3611 μg/mg.fr.wt., 뿌리에서 3.0213 μg/mg.fr.wt.이었다. 반면에 대조구의 잎에서는 5.9652 μg/mg.fr.wt., 줄기에서 3.5974 μg/mg.fr.wt., 뿌리에서 4.3766 μg/mg.fr.wt.이었다. 일차원 SDS-PAGE를 Laemmli 방법으로 수행한 경우 잎은 카드뮴 스트레스에 대하여 내성이 있는 것은 198.7 KD 등 49개가 나타났다. 스트레스로 인하여 사라진 밴드는 160.5 KD 등 4개, 합성된 단백질 밴드는 83.4 KD 등 3개이었다. 줄기에서는 카드뮴 스트레스 내성의 단백질 밴드는 43 KD 등 41개가 나타났고, 사라진 밴드는 114.8 KD 등 5개이었다. 또한 합성되어진 단백질 밴드는 128.7 KD 등 6개가 나타났다. 뿌리에서는 내성 단백질 밴드는 166.9 KD 등 27개, 사라진 밴드는 198.7 KD이었고, 83.4 KD 등 5개의 단백질 밴드가 나타났다.

## 인용문헌

- Bradford M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:48-254
- Choi SB, Lww KW** (1987) Regeneration of glyphosate-resistant plant from tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell culture. *Korean J Bot* **30** (1):69-77
- Cutler JM, Rains DW** (1974) Characterization of cadmium uptake by plant tissue. *Plant Physiol* **54**:67-71
- Gupta SC, Goldsbrough PB** (1990) Phytochelatin accumulation and stress tolerance in tomato cells exposed to cadmium. *Plant Cell Reports* **9**:466-469
- Howden R, Cobbett CS** (1992) Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **99**:100-107
- Huang B, Hatch E, Goldsbrough PB** (1987) Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato. *Plant Science* **52**:211-221
- Jackson PJ, Unkefer CJ, Doolen JA, Watt K, Robinson NJ** (1987) Poly ( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)glycine: Its role in cadmium resistance in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:6619-6623
- Jackson PJ, Unkefer PJ, Delhaiza E, Robinson NJ** (1990) Mechanisms of trace metal tolerance in plants. In F Katterman, ed, *Environmental Injury to Plants*. Academic Press Inc pp 232-255
- Kim YH, Chae YA** (1985) Selection of resistant cell line to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* at callus level and plant regeneration in *Nicotiana tabacum*. *Agric. Rese. of Seoul Nat'l Univ* **10** (1):29-34
- Kneer R, Zenk MH** (1991) Phytochelatin protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* **31** (8):2663-2667
- Laemili UK** (1970) Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Miyasaka SC, Kochian LV, Shaff JE, Foy CD** (1989) Mechanism of aluminum tolerance in wheat. *Plant Physiol*. **91**:1188-1196
- Nakata K, Kurihara** (1972) Competition among pollen grains for haploid tobacco plant formation by anther culture. *Japan J Breed* **22**:92-98
- O'Farrell P** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J Biol Chem* **250**:4007-4021
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK** (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physio Plan* **85**:85-89
- Sugiyama M** (1991) Heavy metal and oxygen free radical. *組織培養*. **17** (2):47-50
- Vallee BL, Ulmer DD** (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann Rev Biochem* **41**:91-128
- Zhang G, Taylor GJ** (1989) Kinetics of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of *triticum aestivum* L. *Plant Physiol* **91**:1094-1099

(접수일자 2001년 1월 10일)