

Pb가 당근 배양세포의 성장에 미치는 영향에 대한 전자현미경적 연구

황 백 · 정 상 진 · 강 영 희

연세대학교 이과대학 생물학과

The Effect of Lead on the Growth of Carrot Callus: An Ultrastructural Study

Baek Hwang, Sang - Jin Chung and Young - Hi Kang

Dept. of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul, Korea

Abstract

The present work has been carried out mainly to determine the effect of lead on the growth and cell organelles of Carrot (*Daucus carota* L.) callus.

1 mM of lead nitrate is added to the culture media R-2 and callus cells are cultured for 16 days. The growth rate is measured by fresh weight and structural changes of cell organelles is observed by electron microscope at every 4 days.

The results show that lead inhibits the growth of Carrot callus and disturbs the structure of mitochondria remarkably.

I. 서 론

Lead는 환경오염원중 중요한 것으로 사람에게도 매우 Toxic한 중금속물질이다. Pb오염원은 주로 가솔린의 연소에 의한 것이며(14), 배출된 Pb는 도로변등을 포함한 인간의 생활권내에 분산되기 마련이다(18).

그러므로 공장지대일수록 Pb의 대기 및 토양 오염은 더욱 심화되어(5) 여러가지 문제점을 야기하게 되는 것이다.

이러한 Pb의 독성에 대해서는 많은 연구자들에 의해 동물과 식물에 대한 영향이 연구되었는데 동물에서는 Lead가 mitochondria에 축적되어 ATP synthesis 및 mitochondria의 enzyme activity를 저해하여 결국 세포가 사멸, 용해됨이 밝혀졌고(22), 또한 Fe 대사 및 Heme 형성을 저해하고 mutagenic agents로서(3) brain damage를 야기하며 공장지대에서는 범퍼울의 증가가 Pb오염과 유관함이 시사되었다(2).

식물에 대한 영향도 여러 보고가 있었는데(1, 20), 이러한 Pb오염은 주로 airborne source로서 농경지

의 오염에 의한 것이다. 일반적으로 토양의 Pb함량은 공장지대 및 고속도로 연변일수록 많아졌다(4, 10, 11, 12, 13, 15).

이들 중금속들은 식물의 광합성, 대사를 저해하여 성장을 억제하고(7, 21), 이렇게 흡수된 Pb는 결정 모양으로 되어 세포벽 및 핵에 축적되어 세포대사를 저해함이 밝혀졌다(6, 15, 16).

본 연구에서는 이러한 major chemical pollutant인 Pb를 조직배양에 이용, callus에 처리하여 cell-level에서의 성장율을 관찰하였고 전자현미경을 이용하여 세포에 미치는 Pb의 영향을 고찰하였다.

II. 실험재료 및 방법

본 실험에 사용한 Carrot (*Daucus carota* L.) callus는 본대학 식물학교실에서 유기, 계대배양하고 있는 것을 사용하였다.

Culture media는 R-2(19)를 사용하였고, initial pH는 6.0으로(Table 1.), Pb원은 Pb(NO₃)₂로서 1 mM을 첨가하여 실험구로 설정했다.

Callus culture는 이미 보고된(9) 방법에 따랐고 성장율은 fresh weight로 비교하였다.

시료의 채취는 매 4일마다 행하였으며 기보의 방법으로 여과하여 fresh weight를 측정한후 전자현미경의 시료로 삼았다.

Table 1. Medium Composition for Tissue Culture

Macroelements	mg/l	mM
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	312.0	2.0
KNO ₃	4,044.2	40.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	322.8	2.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.4	1.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.0	1.0
Microelements	mg/l	
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.536	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.191	
H ₃ BO ₃	2.847	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.195	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.125	
Fe·EDTA	15.581	
Vitamin & Hormone	mg/l	
Inositol	100.0	
Thiamine-HCl	1.0	
2,4-D	2.0	
Casein	2000.0	
Sucrose	20g/l	
pH	6.0	

전자현미경적 방법은 위의 시료를 각각 0.1M phosphate buffer로 완충된 pH 7.4의 3% glutaraldehyde로 4°C에서 2시간 고정한 후 위 완충액으로 30분간 세척한 다음 다시 위의 완충액으로 조절된 pH 7.4의 2% Osmium tetroxide에 4°C에서 2시간 고정하였다. 脫水는 Ethanol 농도 상승순으로 행하였으며 Propylene Oxide로 완전탈수하여 Epon 812에 包埋하였다. 초박절편은 Sorvall MT2-B, Porter-blum Ultramicrotome을 사용하여 500-600Å 두께의 절편을 만들었으며 포화 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 Hitachi HS-7S형 전자현미경으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 성장을

Fig. 1은 Carrot callus의 성장에 미치는 Pb의 영향을 fresh weight로 표시한 것이다. 접종 4일째 까

지의 성장은 두 실험구에서 모두 steady한 상태로 지속되었으나 8일째인 logarithmic phase에서는 control구가 466% 증가한 반면 Pb를 첨가한 실험구에서는 293%밖에 증가하지 않았다. 또한 control구에서는 8-12일까지 즉 logarithmic phase에서 stationary phase까지도 계속적인 성장을 보여주어 590%의 성장율을 보여 주었으나 Pb를 첨가한 실험구에서는 오히려 감소하기 시작하여 stationary phase에서는 130%정도로 성장율이 완전히 떨어졌는데 이것은 Pb의 세포내의 축적으로 인한 damage가 일어나는 것으로 생각된다.

이러한 결과는 Huang(7)이 Pb를 처리한 legume의 fresh weight에서 본 결과와 일치하였고 Wilkins(23)가 root 성장에서 관찰한 결과와도 일치하였는데 이들은 이러한 현상이 중금속이 식물체에서 nitroge-nase activity 및 광합성율을 depress하기 때문이라고 말하였다.

또한 Walton(22)은 쥐의 간세포 mitochondria에 축적되어 ATP 합성 및 mitochondrial enzyme activity를 저해하여 세포의 dissolution을 일으킨다고 하였는데 본 실험에서도 Pb첨가 실험구에서는 성장율의 저하를 가져왔고, 이에 대한 전자현미경적 관찰에서도 Carrot callus세포의 mitochondria가 Pb독성으로 dissolution이 일어난 것으로 보아 세포의 대사의 저하를 가져온 것으로 생각되었다.

2. 세포내의 변화

Initial stage에서의 세포는 Israel et al. (8)이 이미 보고한 바와 같이 mitochondria의 형태가 비교적 구형을 이루고 있었으며 cristae의 수도 많지 않은 것으로 나타났다(Fig. 2).

그리고 Pb첨가후 4일이 지난 구는 Israel et al.의 보고와 같이 세포내 mitochondria의 elongation 현상이 현저하게 나타났으며 cristae의 수에 있어서도 많은 증가를 보였다. 그러나 세포기관, 특히 mitochondria에 대한 Pb의 영향은 거의 관찰되지 않았다. 그런데 Israel et al.은 이때의 mitochondria의 elongation 및 cristae수의 증가를 세포의 왕성한 성장때문이며 이는 이에 따른 에너지의 공급과 관련이 있다고 설명하고 있다(Fig. 3).

그러나 Pb처리후 8일이 지난 세포에서는 mitochondria가 다시 타원형으로 수축되기 시작했으며 간간히 mitochondria의 내부구조가 붕괴된 것이 나타났고 mitochondria내의 cristae수도 감소하는 경향을 나타내었는데(Fig. 4), Pb첨가 실험구가 8일이 후 성장율이 감소하는 것과 밀접한 관계가 있는 것

으로 보인다(Fig. 1).

Pb 첨가후 12일이 지난 세포에서는 mitochondria의 구조가 해체되는 현상이 현저하게 나타났으며(Fig. 5), 16일이 지난 세포에서는 mitochondria의 구조를 식별하기 어려운 정도로 파괴되었고 다른 기관도 구별이 어려운 정도로 혼란되었는데 이는 mitochondria의 파괴에 의해 세포내 대사의 차단에 의한 간접적인 분해로 사료된다(Fig. 6).

그러나 Walton(22)이 보고한바와 같이 쥐에 Pb를 투여하는 경우 간세포의 mitochondria 안에 Pb가 granule로 축적되는 현상은 관찰되지 않았으며, Malone et al.(17)이 보고한 바와 같이 콩과식물에 Pb를 처리할 경우 그 뿌리세포의 세포벽에 Pb가 축적되는 Pb 축적현상도 일어나지 않았다.

이상의 전자현미경적 고찰로 보아 Pb는 Carrot callus 세포에서 주로 mitochondria에 치명적인 영향을 미치며 세포벽을 포함한 다른 기관에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 추정되어진다.

IV. 결 론

Pb가 식물의 성장 및 세포기관에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Carrot (*Daucus carota* L.) Callus를 재료로 하여 suspension culture에 의한 성장을 측정과 전자현미경적 관찰을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

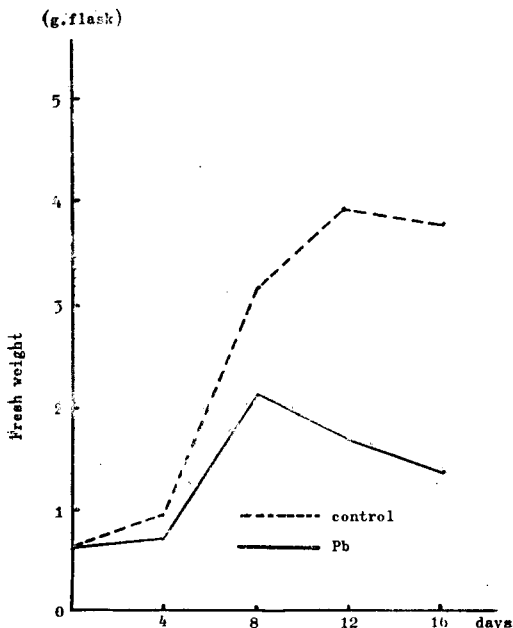


Fig. 1. Effects of Pb on growth of Carrot Callus.

1. Pb는 Carrot Callus의 성장을 현저하게 억제하였다.

2. Pb는 mitochondria의 구조를 현저하게 혼란시켰는데 이것은 세포성장의 주요한 저해요인으로 사료되었다.

References

1. Brewer, R.F. (1966): Lead, p.213-217 In H. D. Chapman, Diagnostic Criteria for Plants and Soils. Univ. Calif., Div. Agric. Sci.
2. Bryce-Smith, D. and H.A. Waldron. (1974): Lead, Behaviour and Criminality. *The Ecologist*. 4, 367-377.
3. Bryce-Smith, D. (1975): Heavy metals as contaminants of the human environment. The Educational Techniques Subject Group Chemistry Cassette. *The Chem Soc. London*.
4. Cannon, H.L. and J.M. Bowles. (1962): Contamination of Vegetation by Tetraethyl Lead. *Science* 137, 765-766.
5. Day, J.P., H. Hart and M.S. Robinson. (1975): Lead in Urban Street Dust. *Nature* 253, 343-345.
6. Hammett, F.S. (1928): The localization of lead within the cell of the growing root. *Protoplasma* 5, 135-141.
7. Huang, C.Y., F.A. Bazzaz and L.N. Vanderhoef (1974): The Inhibition of soybean Metabolism by Cadmium and Lead. *Plant Physiology* 54; 122-124.
8. Israel, W.H. and F.C. Steward (1966): The fine structure of Quiescent and growing carrot cells; its relation to growth induction. *Annals of Botany*. 30, 63-79.
9. Kang, Y.H., B. Hwang (1977): Effects of various hormones on growth of carrot tissue culture. *Korean J. Bot.* 20, 63-69.
10. Kloke, A. and H.O. Leh. (1969): Proceedings of the first European congress on the influence of air pollution on plants and animals. 259
11. Lagerwerff, J.V. (1967): Heavy metal contamination of soils in "Agriculture and the Quality of our Environment." N.C. Brady, ed., *Amer. Assoc. Adv. Sci.*, Publ.85, 343-364.
12. Lagerwerff, J.V. (1970): Uptake of Cadmium,

- Lead and Zinc by Radish from Soil and Air. *Soil Science.*, 111, 129-133.
13. Lagerwerff, J.V. and A. Specht (1970): Contamination of roadside soil and vegetation with cadmium, nickel, lead and zinc. *Environ. Sci. Tech.*, 4, 583-586.
 14. Lagerwerff, J.V. (1972): Lead, mercury and cadmium as environmental contaminants, p.593-636. In *Micronutrients in Agriculture*. edited by J.J. Mortvedt, P.M. Giordano and W.L. Lindsay, Soil Sci. Soc. Amer., Madison, U. S.A.
 15. Lee, J.A. and J.H. Tallis (1973): Regional and historical aspects of lead pollution in Britan. *Nature*. 245; 216-218
 16. Libanti, C.M. and C.J. Tandler (1969): The distribution of the water-soluble inorganic orthophosphate ions within the cell; accumulation in the nucleus. *J. Cell. Biol.* 42; 754-765
 17. Malone, C., D.E. Koepe and R.J. Miller (1974): Localization of lead accumulated by corn plants. *Plant Physiology*, 53; 388-394.
 18. Murozum, M., J.J. Chow and C. Patterson (1969): Chemical concentrations of pollutant lead aerosols, terrestrial dust and sea salts in Greenland Antarctic snow strata, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 33; 1247-1294.
 19. Ohira, K., K. Ojima (1973): Studies on the nutrition of rice cell culture. I. A simple defined medium for growth in suspension cultures. *Plant and Cell Physiology*, 14;1113-1121
 20. Page, A.L., T.J. Ganje and M.S. Ioshi (1971): Lead quantities in plants, soils and air near some major highways in southern California, *Hilgardia* 41;1-31
 21. Simola, L.K. (1977): The tolerance of *Sphagnum fimbriatum* towards lead and cadmium. *Ann. Bot. Fennici* 14;1-5
 22. Walton, J.R. (1973): Granules containing lead in isolated mitochondria. *Nature*. 243; 100-101
 23. Wilkins, D.A. (1957): A technique for the measurement of lead tolerance in plants. *Nature*, 180;37-38

Legends to Figures

- Fig. 2. Electron micrograph of carrot callus cell at initial stage. Mitochondria is spherical form and have a few cristae. m: mitochondria, c: cell wall (X78,000)
- Fig. 3. Electron micrograph of carrot callus cell at 4 days after adding Pb (NO₃)₂. Mitochondria is elongated and have many cristae. m: mitochondria, g: Golgi body (X95,000)
- Fig. 4. Electron micrograph of carrot callus cell at 8 days after adding Pb (NO₃)₂. Mitochondria is shortened and disturbed a little (→). m: mitochondria (X62,000)
- Fig. 5. Electron micrograph of carrot callus at 12 days after adding Pb (NO₃)₂. Mitochondria is extremely disturbed (→). At cell wall, lead is not accumulated. m: mitochondria, c: cell wall (X70,000)
- Fig. 6. Electron micrograph of carrot callus cell at 16 days after adding Pb (NO₃)₂. Mitochondria does not have its structure (→). And most of cell organelles are disturbed. At cell wall, lead is not accumulated. m:mitochondria g:Golgi body C:cell wall (X90,000)

