

내염성 담배 캘러스에 대한 NaCl의 효과

車賢哲·孫宗玄*·金甲植*·崔光泰*·李光雄**

(檀國大學校 生物學科, *韓國人蔘煙草研究所, **서울大學校 生物學科)

Effect of NaCl on Salt-tolerant Callus in Tobacco

Cha, Hyeon-Cheol, Jonghyeon Sohn*, Kap-Sik Kim*,
Kwang Tae Choi* and Kwang-Woong Lee**

(Department of Biology, Dankook University, Cheonan,

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, and

**Department of Biology, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Effects of various NaCl concentrations on salt-tolerant callus of tobacco were investigated. Selection of NaCl-tolerant (S) callus was conducted by subculturing *Nicotiana tabacum* cv. BY 4 callus in 200 mM NaCl-containing MS medium for more than 18 months. In spite of the long subculture period, characteristics of salt tolerance were maintained very stably. Significant differences were found in ion contents of each callus which was subcultured with treatment of various NaCl concentrations: Na⁺ and Cl⁻ became higher but Mg²⁺, Ca²⁺ and K⁺ became lower with the increasing external salt contents. Therefore, the ratios of Na⁺/Ca²⁺ and Na⁺/K⁺ also increased resulting close to those of halophytic property. The contents of chlorophylls and carotenoids in S callus were estimated to 3.1 and 2.9 times more, respectively, than those of non-selected (NS) callus (control). The higher content of external NaCl tended to increase the amount of water soluble proteins and to decrease the amounts of the total sugars, reducing sugars and free amino acids. The activity of peroxidase was increased with higher contents of external NaCl in S callus, but it was maintained at a higher level than S callus at lower NaCl, followed by a subsequent decrease above 80 mM NaCl in NS callus. These results suggest that S callus may have a biological system converting energy source to efficient growth leading to reduction of the growth inhibition under stress environment.

서론

염해를 받고 있는 지역은 세계적으로 약 4백만 km²에 달하고(Flowers *et al.*, 1977) 이 중에서 230만 km²은 잠재적으로 작물 생산을 할 수 있는 곳으로 알려져 있다(Ponnamperuma, 1984). 그러나 불행히도 대부분의 작물은 염해에 약하므로 지금까지의 연구는 NaCl이 야기하는 상해나 내염성 기작에 관해 식물체 수준에서 추구하고는 데 집중되

었다(Flowers *et al.*, 1977; Greenway and Munns, 1980). 그리고 중생식물로부터 내염성을 지닌 품종을 선발하거나 내성을 지닌 야생종과 재배종사이의 교배를 통한 육종학적 품종개발이 시도되어 왔다. 그러나, 세포수준에서의 염의 장해나 내염성의 기작에 관한 보고는 상대적으로 빈약하여(Watad *et al.*, 1983; Binzel *et al.*, 1988; Ben-Hayyim *et al.*, 1985; LaRosa *et al.*, 1985; Lerner, 1985; Heyser *et al.*, 1989), 세포수준에서의 내염성 기작을 이해하는 것이 조직이나 식물체 수준에서의 기작을 밝히는 데 필수적이다. 식물에 염류 장해가 일어나는 기작을 살펴보면, 첫째, 체내의 수분포텐셜을 떨어뜨려 수분의 세포내에서의 이용을

본 연구는 1990년 단국대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

감소시키며(Yeo, 1983), 둘째, 외부의 이온농도가 높아짐으로써 과량의 이온이 세포내로 유입되어 개체의 생리·생화학적 반응을 간섭하며(Hurkman and Tanaka, 1987), 셋째, 세포내 이온의 과축적으로 영양분의 결핍을 유발한다(Stavarek and Rains, 1985). 그러므로 내염성의 기작은 외부의 높은 이온에 대응하여 이온을 액포내에 축적하거나 세포내의 삼투압을 낮추기 위하여 유기물을 생산하여 세포질에 축적하는 구획화에 의해 팽압을 유지한다. 유기물은 삼투조절제로 작용하는데 아미노산, 유기산같은 질소화합물(Storey and Wyn Jones, 1977; Dix and Pearce, 1981; Heyser and Nabors, 1981b), 여러가지 탄수화물(Heyser and Nabors, 1981b; Sacher and Staples, 1985; Gorham *et al.*, 1988)이 이의 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 증생식물에서는 탄수화물이 보편적으로 우세하여 삼투조절제로써 작용한다(Flowers *et al.*, 1977; Hanson and Hitz, 1982).

반면 내염성 세포주에서 염해와 세포 내부의 이온 양의 변화에 관한 특성은 종에 따라 상이하여 내염성 세포는 선발되지 않은 정상 세포보다 더욱 효과적으로 염을 배출하거나(Jia-Ping *et al.*, 1981), 서로 차이가 없이 둘다 Na^+ 와 Cl^- 을 똑같이 잘 흡수하거나(Dix, 1980), 낮은 농도의 염에서는 Na^+ 와 Cl^- 의 축적에 차이가 없으나 고농도의 NaCl에서는 선발된 내염성 세포가 더욱 많은 양의 Na^+ 와 Cl^- 을 축적한다(Pandey and Ganapathy, 1984)는 상반된 결과가 보고되었다. 그러나 K^+ 에 관해서는 내염성 세포에서 염해가 증가할수록 높은 수준을 유지하였다는 보고가 많이 있다(Croughan *et al.*, 1978; Watad *et al.*, 1983; Pandey and Ganapathy, 1984; Stavarek and Rains, 1984a, b). 이와 같이 내염성의 특성 및 기작에 관한 보고는 연구자에 따라 상반된 결과(예를 들면, 생장 반응, 이온의 축적, 유기물의 흡수 및 대사에서의 이용)들이 나타나므로 식물종에 따라 서로 다른 기작을 지닐 수 있다.

따라서, 본 연구는 조직배양에 많이 사용되는 담배를 재료로 NaCl에 내성을 지닌 캘러스를 선발하고 선발한 내염성 세포에 대한 NaCl의 효과, 즉 생장, 이온의 축적, 아미노산, 당의 축적 등을 조사하여 어떠한 유기물질이 삼투조절제의 역할을 수행하는가를 검토하며, 내염성 세포와 비내염성 세포의 효소 활성, 간접적인 광합성능을 비교하여 세포수준에서의 내염성의 기작을 구명하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료. 담배(*Nicotiana tabacum* L.)의 황색종 품종인 BY 4는 한국인삼연구소 수원 경작시험장(경기도 화성군 당수리)의 포장에서 재배한 것으로 개화전 성숙한

식물체를 캘러스 유도 및 내염성 캘러스 선발의 재료로 사용하였다.

캘러스의 유기 및 배양. 엽병을 2% sodium hypochlorite 용액에서 살균한 뒤 멸균수로 5회 세척하여 2~3 mm 절편을 만들고, 이를 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지에 1개월 치상하여 캘러스를 유기시켰다. 이후 유기된 캘러스 조직을 떼어내어 MS 기본배지에 생장조절제로 3.3 μM 2,4-D, 0.15 μM kinetin이 첨가된 고체배지(0.8% agar 포함, 이하 MS 배지라 함)에 치상하여 27°C, 16/8시간 광주기로 조절된 배양실에서 행하였고 5주 간격으로 계대배양하였다.

내염성 캘러스의 선발. 160 mM NaCl이 함유된 MS 배지에서 생장하는 캘러스를 200 mM NaCl이 첨가된 동일배지에서 배양하여 왕성한 생육을 나타내는 캘러스를 NaCl 내성 세포주로 선발하였다. 선발된 캘러스는 동일배지에서 18개월 이상 장기간 계대배양하여 내염성의 특성을 안정화시켰다. 선발된 NaCl 내성 캘러스가 단순히 생리적인 적응의 결과라면 배양 조건이 달라짐에 따라 이의 특성이 변할 수 있으므로 선택압이 없는 조건에서도 내염성을 유지하는가를 알아보기 위하여 NaCl 내성 캘러스를 NaCl 무첨가배지에서 5번 계대배양한 후 다시 200 mM 첨가배지로 옮겨 생장을 조사하였다.

내염성 캘러스의 생장. MS 배지에서 계대배양한 정상 캘러스와 200 mM NaCl 배지에서 선발한 캘러스를 0, 120, 200 mM NaCl로 첨가한 배지에 치상하여 40일간 배양한 후 생체중을 측정하였다.

무기이온의 함량. 정상 및 선발된 캘러스를 70°C, 48 시간 건조시킨 후 미세분말로 만들고 0.2 g을 50 mL kjeldahl flask에 넣고 여기에 1 mL의 60% HClO_4 , 1 mL의 진한 황산, 5 mL의 진한 질산을 넣은 분해액을 첨가, 가열하여 유기물을 제거한 뒤 희석하여 원자흡수분광기(Hitachi 207)로 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 등의 함량을 분석하였다. Cl^- 의 함량은 0.1 N HNO_3 액으로 침출하여 AgNO_3 로 적정하여 argentometric method로 측정하였다.

엽록소 및 카르티노이드의 함량. 엽록소 함량은 캘러스 1g에 80% 아세톤 8 mL을 첨가하여 마쇄한 후 상정액을 663 nm, 644 nm에서 흡광도를 측정하여 Holden (1965)의 방법으로 환산하였다. 카르티노이드의 함량 역시 상기의 방법으로 얻은 용액의 흡광도를 452 nm의 파장에서 측정하여 상대 카르티노이드양으로 나타내었다.

당의 함량. 시료액의 제조는 Sagisaka(1987)의 방법을 변형하여 사용하였다. 캘러스 0.5 g을 sea sand 및 5 mL의 0.2 N perchloric acid와 함께 0°C의 유발에서 마쇄하였다. 마쇄액을 10,000 g에서 20분간 원심분리하고 상정액을 취한 후 KHCO_3 분말을 가하여 pH 4 정도 되도록 조정하였다. 이를 재원심분리한 후 상정액을 시료액으로 사용하였다. 정량은 Somogyi-Nelson법으로 측정하였다(Nelson, 1944).

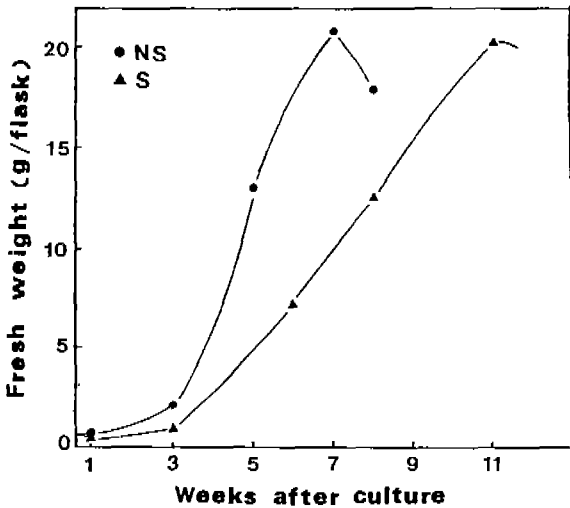


Fig. 1. Growth curves of selected (S, 200 mM NaCl-tolerant) and non-selected (NS) *N. tabacum* cv. BY 4 calli.

시료액 0.5 mL에 low-alkaline copper reagent 1 mL를 첨가하고 끓는 수조에서 10분간 중탕한 후 냉각시켰다. 여기에 arsenomolybdate reagent 1 mL를 첨가하여 교반한 뒤 적당량의 증류수를 가하여 희석하였다. 실온에서 15~20분간 방치하고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 포도당을 이용하여 동일 방법으로 구하고 시료의 환원당 함량을 이로부터 산출하였다.

수용성 단백질 및 유리 아미노산의 함량. 캘러스 1 g을 70 mM 인산 완충용액(pH 8.0) 5 mL와 함께 마쇄한 후 10,000 g에서 20분간 원심분리하였다. 상침액 0.5 mL에 20% TCA 용액 0.5 mL와 혼합하여 하룻밤 정치시킨 후 다시 원심분리하여 pellet을 취하였다. 5 mL의 0.1 N NaOH로 pellet을 용해시킨 후, 이 시료액을 Lowry 등 (1951)의 방법에 따라 500 nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin을 이용하여 단백질 함량을 산출하였다. 유리 아미노산은 Yemm과 Cocking(1955)의 ninhydrin 반응으로 측정하였다. 동일 시료액 1 mL에 0.5 mL의 0.2 M citrate buffer(pH 5.0)를 첨가하고 여기에 0.2 mL의 methyl cellosolve-ninhydrin 용액[ninhydrin을 5%(w/v)되게 methyl cellosolve에 녹인 것]과 1 mL의 potassium cyanide-methyl cellosolve 용액(0.01 M potassium cyanide를 methyl cellosolve로 50배 희석)을 첨가하여 100°C에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 수돗물로 식히고 570 nm에서의 흡광도를 측정하고 표준시료로 glycine을 사용하였다.

Peroxidase의 활성. 2.95 mL의 0.1 M 인산 완충용액(pH 5.8, 5 mM guaiacol, 5 mM H₂O₂ 포함)에 동일 시료액을 50 µL 넣고 470 nm에서 60초 동안의 흡광도 증가를 측정하여 활성을 구하였다(Zachary and Brent, 1974).

결과 및 고찰

NaCl 내성 캘러스의 성장 특성. 선발한 내염성 캘러스의 성장특성을 규명하기 위하여 정상 캘러스를 NaCl을 첨가하지 않은 배지에서, 선발된 내염성 캘러스를 200 mM NaCl을 첨가한 배지에서 각각 11주 동안 배양하여 성장량을 측정하였던 바, 내염성 캘러스는 성장속도가 정상 캘러스보다 느린 경향을 보였으며 정상 캘러스의 경우, 배양 후 약 7주경에 최대 생체중을 나타내었고, 선발된 캘러스는 배양 11주까지도 계속 성장하여 이때의 생체중은 정상 캘러스와 비슷한 20 g 정도였다(Fig. 1). 이로 미루어 보아 선발된 NaCl 내성 캘러스는 200 mM NaCl 배지에서도 왕성하게 성장함을 알 수 있고 정상 캘러스보다 긴 lag phase를 가지는 것으로 나타났다. 그리고 두 캘러스의 성장 양상은 비슷하나 다만 7주까지 내염성 캘러스의 생장은 정상 캘러스의 50%를 차지하고 이후 정상 캘러스는 decline phase에 도달하는 데 비해 11주 후에 최대 성장에 도달하기 때문에 osmotic stress에 의해 생장이 지연되는 것으로 생각된다. Chen 등(1980)은 담배 캘러스에서 배지의 높은 염의 농도가 초기생장을 지연시키는 요인이 되었다고 하였다. Heyser와 Nabors(1981b)는 적응된 담배세포가 79 mM NaCl에서 성장하였을 때, 무염배지에서 자라는 세포에 비하여 생장이 감소되었다고 하였다. Watad 등(1983)도 담배에서 150, 200 mM NaCl에 내성인 캘러스를 선발하여 성장유형을 비교한 결과 5~10일의 lag phase를 가진 후 자라기 시작하여 배양 후 20일에는 정상 캘러스의 50% 성장을 하였다고 보고하였다. 그리고, 정상 캘러스를 200 mM NaCl 첨가배지에 옮겨 배양할 경우, 거의 죽거나 극히 일부만이 생존하여 아주 느린 속도로 자라는데 이런 점으로 보아, 본 실험에서 선발된 캘러스는 200 mM NaCl에서 18개월 이상 계대배양하여 얻어진 것으로서 NaCl 내성에 안정성이 있는 것으로 판단된다. 돌연변이원에 의한 처리이거나 계대배양에 의해 선발된 것이건 상관없이, 선발된 캘러스는 고농도의 NaCl에서 성장할 수 있는 것으로 나타났다(Nabors *et al.*, 1975, 1980), 이것이 단순히 세포 내의 생리적인 변화 때문인지, 아니면 유전자의 변화에 기인되어 후대에 유전될 것인지에 대해서는 더 연구 검토되어야 한다.

200 mM NaCl 첨가배지에서 선발한 캘러스가 외부의 장해요인이 없을 때 장기간 특성의 소실없이 내염성을 유지할 수 있는가를 점검하기 위하여, 내염성 캘러스를 NaCl 무첨가배지에서 18개월간 계대배양한 후 NaCl 첨가배지에 접종하여 성장상태를 조사하였다. Table 1에서 보이는 바와 같이 1st passage에서는 선발된 캘러스가 정상 캘러스보다 모든 처리구에서 생장이 월등히 좋았으나 200 mM에서는 성장저해를 나타내어 무첨가배지에서의 48.6%에 불과하였

Table 1. Effect of NaCl on the growth of non-selected and selected salt-tolerant *N. tabacum* cv. BY 4 calli in two passages

| Passage | Concentration of NaCl (mM) | Fr wt (g/flask) of | |
|------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------|
| | | Non-selected | Selected ^a |
| 1st (40 days) | 0 | 16.4±1.4 | 17.9±2.5 |
| | 120 | 2.8±0.6 | 14.4±1.8 |
| | 200 | 0.9±0.2 | 8.7±2.4 |
| 2nd (45 days) | 0 | 15.5±2.4 | 20.5±2.4 |
| | 120 | 16.8±2.6 | 17.8±2.0 |
| | 200 | 6.9±2.5 | 22.0±2.0 |

^aSelected salt-tolerant callus was subcultured on the NaCl-free medium for 18 months before this experiment.

다. 그러나, 2nd passage에서는 양상이 상이하여 200 mM에서도 생장의 저해없이 왕성히 성장하여 대조구에 비해 3.2배의 생체중을 나타냄으로써 빠른 시일내 내염성을 회복함을 알 수 있었다. 그리고 정상 캘러스의 경우, 120 mM에서의 생체중이 1차 계대배양에서는 2.8 g으로 생장이 저조하였으나 2차 계대배양에서는 16.8 g으로서 무처리구와 비교할 때 차이가 없었으며, 보다 높은 200 mM에서는 6.9 g으로서 선발된 캘러스의 생체중인 22.0 g의 32% 가량 되었으나, 장기간 배양할 경우 더 이상의 생체중의 증가는 뚜렷하지 않았다.

무기이온의 함량. 외부 NaCl에 의한 캘러스내 무기이온의 함량 변화를 조사한 결과 Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ 은 NaCl의 농도가 증가할수록 감소하였으나, Na^+ 와 Cl^- 은 급격히 증가하였다. Na^+/Ca^{2+} , Na^+/K^+ 의 비율도 역시 증가하여 염생식물의 이온 함량과 같은 특성을 보였다(Table 2). 일반적으로 외부의 NaCl 농도가 증가할수록 Na^+ , Cl^- 의 세포내로의 흡수가 높아진다고 보고되어 있으나(Croughan

et al., 1978; Tal *et al.*, 1978; Nabors *et al.*, 1980; Heyser and Nabors, 1981a; Ben-Hayyim and Kochba, 1983), K^+ 함량에 관하여는 이견이 있어 알팔파의 경우는 증가하고(Croughan *et al.*, 1978), 오렌지나 토마토의 경우는 감소하며(Tal *et al.*, 1978; Ben-Hayyim and Kochba, 1983), 담배의 경우는 거의 변함이 없다(Nabors *et al.*, 1980)고 보고되었다. 본 실험의 경우, 염의 존재시 무염에 비해 세포내 K^+ 함량이 낮아 Ben-Hayyim과 Kochba(1983)의 결과와 일치하였다. 일반적으로 식물체가 성장하는 환경의 NaCl의 농도가 증가할수록 체내 Na^+ , Cl^- 이온은 증가하고 Ca^{2+} , K^+ 이온은 감소하는 경향이 있는데 담배 캘러스도 같은 경향을 나타내었다.

염생식물은 중생식물보다 세포내에 많은 Na^+ 을 지니고 있으나 이로 인한 장해를 해소시킬 수 있는 기작을 지니고 있으며, Na^+/K^+ ratio가 1.0 이상인 특징을 지니고 있는데(Yeo, 1983), 본 실험에서 선발한 내염성 캘러스의 Na^+/K^+ 비가 3.86으로 염생식물의 특성을 보였다.

엽록소 및 카로티노이드 함량. 배지내 NaCl 농도가 증가함에 따라 내염성 캘러스의 외양이 녹색으로 변화되었으며, 세포내 엽록소 함량도 증가하였다. 즉 정상세포의 전엽록소 함량이 g 생체중당 22.1 μ g인 반면, 200 mM NaCl 내성 캘러스는 엽록소 a, b 모두 증가하여 69.0 μ g이었다. 또한, 카로티노이드 함량 역시 8.6 μ g에서 25.0 μ g으로 증가하였다(Table 3).

일반적으로 NaCl은 식물의 광합성을 저해하고 엽록소의 감소를 유발하는 요인으로 알려져 있으나 본 실험에서는 이와 상반되는 결과를 가져왔다. 이는 배지에 성장조절제로서 0.66 mg/L 2,4-D가 함유되어 있는 바, 2,4-D는 제초제의 일종으로 잎의 엽록소의 함량을 감소시키는데 NaCl과 동시에 처리하였을 때 캘러스의 엽록소와 카로티노이드 함량이 오히려 증가한 사실은 NaCl과 2,4-D 사이에는 어떤 길항적인 작용이 있어 엽록소의 파괴를 상쇄하거나 오히려 억제한다고 생각할 수 있으며, NaCl 내성 캘러스는 2,4-D가

Table 2. Effect of NaCl on the contents of the inorganic ions of *N. tabacum* cv. BY 4 calli^a cultured for 5-7 weeks

| Concentration of NaCl (mM) | Contents (%) of | | | | | Ratio of | |
|----------------------------|-----------------|-------|-----------|-----------|--------|------------|----------------|
| | Na^+ | K^+ | Ca^{2+} | Mg^{2+} | Cl^- | Na^+/K^+ | Na^+/Ca^{2+} |
| 0 | 0.25 | 5.46 | 0.90 | 0.20 | 2.48 | 0.04 | 0.28 |
| 40 | 1.03 | 4.89 | 0.85 | 0.20 | 7.15 | 0.21 | 1.21 |
| 80 | 2.90 | 4.13 | 0.71 | 0.18 | 11.31 | 0.70 | 4.08 |
| 120 | 2.10 | 3.52 | 0.53 | 0.14 | 13.30 | 0.60 | 3.96 |
| 160 | 4.80 | 3.40 | 0.55 | 0.15 | 17.93 | 1.41 | 8.73 |
| 200 | 9.54 | 2.47 | 0.34 | 0.10 | 15.15 | 3.86 | 28.04 |

^aMaintained for more than 18 months at the same NaCl concentration that treated respectively in this experiment.

Table 3. Effect of NaCl concentrations on chlorophyll and carotenoid contents of *N. tabacum* cv. BY 4 calli^a cultured for 7 weeks (unit: µg/g fr wt)

| NaCl (mM) | Chl a | Chl b | Chl a+b | Chl a/b | Carotenoid |
|-----------|-------|-------|---------|---------|------------|
| 0 | 8.6 | 13.5 | 22.1 | 0.64 | 8.6 |
| 40 | 10.6 | 13.3 | 23.9 | 0.80 | 7.1 |
| 80 | 12.6 | 19.2 | 32.1 | 0.67 | 10.3 |
| 120 | 15.7 | 18.5 | 34.0 | 0.85 | 12.0 |
| 160 | 23.6 | 35.0 | 58.6 | 0.67 | 18.8 |
| 200 | 31.4 | 37.6 | 69.0 | 0.84 | 25.0 |

^aBY 4 calli were maintained for more than 18 months at the same NaCl concentration that treated respectively in this experiment.

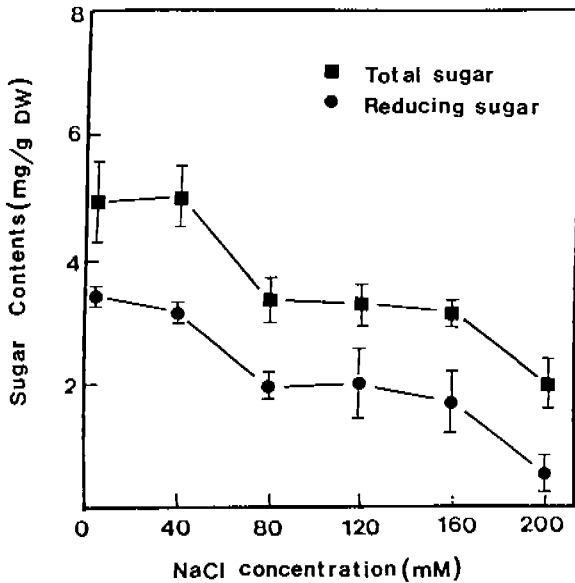


Fig. 2. Sugar contents in *N. tabacum* cv. BY 4 callus cultured on NaCl-containing medium for 7 weeks. The BY 4 calli were maintained for more than 18 months at the same NaCl concentration that treated respectively in this experiment.

유효성분으로 함유된 제조제에도 내성이 있을 것으로 추측된다. 그리고 NaCl 내성 캘러스가 엽록소를 정상 캘러스보다 많이 함유하고 있는 것으로 보아 광합성능도 증가할 것으로 사료된다.

당, 수용성 단백질, 유리 아미노산의 함량. 선발된 내염성 캘러스가 정상 캘러스에 비하여 고농도의 염에 내성을 지니기 위하여 세포내 생리적 대사 및 osmoticum의

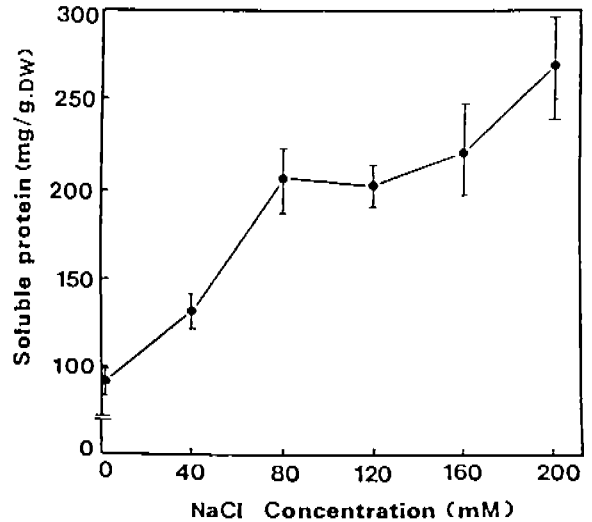


Fig. 3. Effect of NaCl on the contents of soluble protein in *N. tabacum* cv. BY 4 callus cultured for 7 weeks. The BY 4 calli were maintained for more than 18 months at the same NaCl concentration that treated respectively in this experiment.

변화를 가져왔을 것으로 생각되어 무기이온의 함량 외에 당, 수용성 단백질 및 유리 아미노산의 함량을 조사하였다. NaCl의 농도에 따른 당의 함량은 전당과 환원당 공히 NaCl 농도가 증가할수록 감소하였다(Fig. 2). 그러나 수용성 단백질의 함량은 반대로 NaCl 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향이었으며(Fig. 3), 아미노산 함량은 당과 마찬가지로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 4). 이런 점은 분자량이 큰 단백질에 비해 상대적으로 세포막의 투과가 어렵지 않은 당이나 아미노산의 변화가 상반된 결과가 나타난 것으로 미루어 보아 막을 통한 투과성과 관련이 있는 것 같다. 즉 NaCl이 식물에 미치는 효과는 우선 세포막에 영향을 주어 세포내 대사물질을 방출하는 대신 외부의 NaCl을 흡수하게 되어 세포질의 효소활성을 변화시킨다. 따라서 세포내 대사가 원활하게 진행되지 못하고 또한, 식물체의 영양결핍 및 탈수를 유발하여 생장이 억제된다고 하였다(Nabors *et al.*, 1980). 세포의 osmotic shock를 일으키는 NaCl 처리나 저온장해는 heat shock 및 anaerobiosis stress의 경우에는 다른 단백질 유형에 변화를 유발한다. Heat shock이거나 anaerobiosis stress의 경우에는 세포내 단백질 합성 대사에 있어 stress protein이라 할 수 있는 새로운 단백질이 생성되고 대부분의 단백질이 소실되는 데 비해, salt stress의 경우에는 net protein 함량이 증가된다(Aliza *et al.*, 1967). Hurkman과 Tanaka(1987)는 salt stress를 준 보리의 뿌리에서 추출한 단백질을 조사한 결과

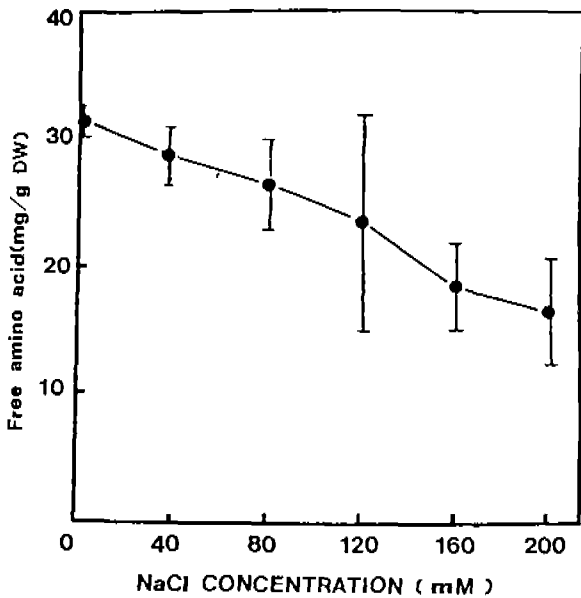


Fig. 4. Effect of NaCl on the contents of free amino acid in *N. tabacum* cv. BY 4 callus in 7 weeks after culture. The BY 4 calli were maintained for more than 18 months at the same NaCl concentration that treated respectively in this experiment.

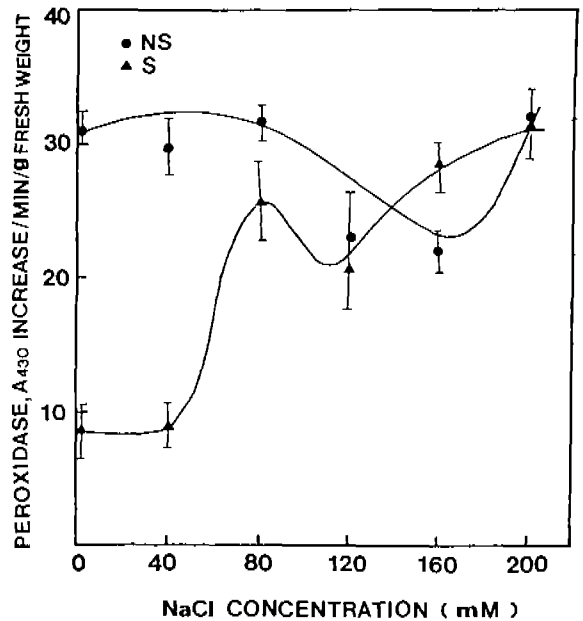


Fig. 5. Effect of NaCl on peroxidase activity in selected (S) and non-selected (NS) *N. tabacum* cv. BY 4 calli in 5 weeks after culture.

분자량이 26 kD 과 27 kD인 2개의 새로운 band를 확인했다고 보고하였다. 본 실험에서 나타난 NaCl의 증가에 따른 단백질 함량의 증가는 불리한 환경조건인 고농도의 염에 저항하기 위하여 세포내 대사활동을 높이기 위한 것으로 생각되며 NaCl 무첨가배지에서의 선발된 내염성 캘러스가 정상 캘러스에 비하여 생체중이 높은 사실도 이를 뒷받침한다. 이러한 빠른 대사활동 때문에 대사의 기질이나 중간 대사물인 당과 아미노산의 함량이 감소되는 것으로 판단된다. 이외 염해를 극복하고 세포가 증식하기 위해서는 정상 조건에서보다 에너지가 많이 소비될 것이며, 세포막을 통한 배지내 당의 흡수도 고농도의 NaCl에 의하여 억제된다고 생각된다. 그러므로 stress에 적응하기 위하여 세포내 단백질의 양을 증가시켜 효율적으로 에너지 대사를 변형하는 것으로 사료된다.

Peroxidase의 활성. Peroxidase의 활성은 정상 캘러스와 내염성 캘러스간의 차이가 뚜렷이 나타나 내염성 캘러스에서는 NaCl 농도가 증가할수록 활성이 증가하는 경향을 보였으나, 정상 캘러스에서는 80 mM까지 높은 수준을 유지하다가 이후 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5). Peroxidase는 일반적으로 노화와 관계가 깊은 것으로 알려져 있어, 내염성 캘러스에서 NaCl의 농도가 증가하여도 그 활성이 떨어지지 않는 것은 정상 캘러스에 비해 NaCl에

생리적으로 적응되어 노화가 느리게 진행되기 때문인 것으로 생각되며 고농도의 NaCl에서도 염해를 받지 않고 계속 성장할 수 있는 것과 관련이 있다고 판단된다. 반면, 정상 캘러스에서는 NaCl 농도가 증가함에 따라 노화가 빠르게 진행되어 이 효소활성이 낮은 것으로 생각된다. 캘러스 수준에서 NaCl에 의한 peroxidase의 활성은 보고된 바가 거의 없으나, 사탕무에서 정상 캘러스의 peroxidase 활성은 NaCl이 없을 때 비교적 높고 NaCl이 존재할 때는 상대적으로 낮다고 하여(Hagege *et al.*, 1990) 본 결과와 일치하였다. 그들은 또한 NaCl 농도가 높아지면 정상 캘러스의 peroxidase 활성은 감소된다고 보고하였으며 이에 대한 설명으로 세포벽의 비목질화(non-lignification)가 peroxidase 활성의 저하를 일으킨다고 하였다.

적 요

내염성 담배(*Nicotiana tabacum* cv. BY 4)의 캘러스를 재료로 하여 NaCl의 농도에 따른 특성과 효과를 규명하고자 하였다. 선발된 내염성 캘러스의 생장은 NaCl 무첨가 배지에서 18개월동안 계대배양한 후에도 안정하게 유지되었다. 세포내 무기이온 함량의 변화는 외부의 NaCl 첨가에 따라 뚜렷하여 Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} 은 NaCl의 농도가 증가할수록 감소하였으나 Na^{+} , Cl^{-} 은 급격히 증가하였으며,

Na⁺/Ca²⁺, Na⁺/K⁺ 비 역시 증가하여 염생식물의 이온 함량과 비슷한 특징을 보였다. 또한 내염성 캘러스의 엽록소 및 카로티노이드의 함량도 증가하는 경향을 보였다. 당 및 아미노산의 함량은 NaCl 농도가 증가할수록 감소하였으며 수용성 단백질의 함량은 증가하는 경향을 나타내었다. Peroxidase의 활성은 내염성 캘러스 경우 NaCl 농도가 높을수록 증가하는 경향을 보였으나, 정상 캘러스는 80 mM까지 높은 수준을 유지하다가 이후 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 특성은 내염성 세포의 경우, 장해 환경하에서 에너지 공급원을 생장에 효율적으로 전환시킬 수 있는 생물학적 시스템을 갖고 있어 염해에 대한 생장억제를 어느 정도 피할 수 있음을 나타낸다고 사료된다.

참 고 문 헌

Aliza, B., C. Itai and Y. Vaadia. 1967. Water and salt stresses, kinetin and protein synthesis in tobacco leaves. *Plant Physiol.* **42**: 361-365.

Ben-Hayyim, G. and J. Kochba. 1983. Aspects of salt tolerance in a NaCl-selected stable cell line of *Citrus sinensis*. *Plant Physiol.* **72**: 685-690.

Ben-Hayyim, G., P. Spiegel-Roy and H. Neumann. 1985. Relation between ion accumulation of salt-sensitive and isolated stable salt-tolerant cell lines of *Citrus aurantium*. *Plant Physiol.* **78**: 144-148.

Binzel, M.L., F.D. Hess, R.A. Bressan and P.A. Hasegawa. 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* **86**: 607-614.

Chen, Y., E. Zahavi, P. Barak and N. Umiel. 1980. Effect of salinity stress on tobacco I. The growth of *Nicotiana tabacum* callus cultures under seawater, NaCl and mannitol stresses. *Z. Pflanzenphysiol.* **98**: 141-153.

Croughan, T.P., S.J. Stavarek and D.W. Rains. 1978. Selection of NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells. *Crop Sci.* **18**: 959-963.

Dix, P.J. 1980. Environmental stress resistance; selection in plant cell cultures. *In*, Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala, F., B. Parisi, R. Cella and O. Ciferri (eds.). pp. 183-186. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Dix, P.J. and R.S. Pearce. 1981. Proline accumulation in NaCl-resistant and sensitive cell lines of *Nicotiana sylvestris*. *Z. Pflanzenphysiol.* **102**: 243-248.

Flowers, T.J., P.F. Troke and A.R. Yeo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**: 89-121.

Gorham, J., O.S. Tomar and R.G. Wyn Jones. 1988. Salinity-induced changes in the chemical composition of *Leucaena leucocephala* and *Sesbania bispinosa*. *J. Plant Phy-*

siol. **132**: 678-682.

Greenway, H. and R.A. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.

Hagege, D., C. Kevers, F. Le Dily, T. Gaspar and J. Boucaud. 1990. NaCl dependent growth rate of normal and habituated sugarbeet calli, ethylene production and peroxidase activity. *C. R. Acad. Sci.* **310**: 259-264.

Hanson, A.D. and W.D. Hitz. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 163-203.

Heyser, J.W., D. De Bruin, M.L. Kincaid, R.Y. Johnson, M.M. Rodriguez and N.J. Robinson. 1989. Inhibition of NaCl-induced proline biosynthesis by exogenous proline in halophytic *Distichlis spicata* suspension cultures. *J. Exp. Bot.* **40**: 225-232.

Heyser, J.W. and M.W. Nabors. 1981a. Osmotic adjustment of cultured tobacco cells (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) grown on sodium chloride. *Plant Physiol.* **68**: 720-727.

Heyser, J.W. and M.W. Nabors. 1981b. Growth, water content, and solute accumulation of two tobacco cell lines cultured on sodium chloride, dextran, and polyethylene glycol. *Plant Physiol.* **68**: 1454-1459.

Holden, M. 1965. Chlorophylls. *In*, Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Goodwin, T. W. (ed.). pp. 461-488. Academic Press, New York.

Hurkman, W.J. and C.K. Tanaka. 1987. Effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol.* **83**: 517-524.

Jia-Ping, Z., E.J. Roth, W. Terzaghi and K.G. Lark. 1981. Isolation of sodium dependent variants from haploid soybean cell culture. *Plant Cell Rep.* **1**: 48-51.

LaRosa, P.C., A.K. Handa, P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. 1985. Abscisic acid accelerates adaptations of cultured tobacco cells to salt. *Plant Physiol.* **79**: 138-142.

Lerner, R.H. 1985. Adaptation to salinity at the plant cell level. *Plant Soil* **89**: 3-14.

Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193**: 256-275.

Nabors, M.W., A. Daniels, L. Nadolny and C. Brown. 1975. Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells. *Plant Sci. Lett.* **4**: 155-159.

Nabors, M.W., S.E. Gibbs, C.S. Bernstein and M.E. Meis. 1980. NaCl tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **92**: 13-17.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.

Pandey, R. and P.S. Ganapathy. 1984. Isolation of sodium chloride-tolerant callus line of *Cicer arietinum* L. cv.

- BG-203. *Plant Cell Rep.* 3: 45-47.
- Ponnamperuma, F.H. 1984. Role of cultivar tolerance in increasing rice production on saline lands. *In*, Salinity Tolerance in Plants. Staples, R. C., G.H. Toennissen (eds). pp. 255-271. Wiley Interscience, New York.
- Sacher, R.F. and R.C. Staples. 1985. Inositol and sugars in adaptation to salt. *Plant Physiol.* 77: 206-210.
- Sagiska, S. 1987. Amino acid pools in herbaceous plant at the wintering stage and at the beginning of growth. *Plant Cell Physiol.* 28: 171-178.
- Stavarek, S.J. and D.W. Rains. 1984a. The development of tolerance to mineral stress. *Hort. Sci.* 19: 377-382.
- Stavarek, S.J. and D.W. Rains. 1984b. Cell culture techniques; Selection and physiological studies of salt tolerance. *In*, Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement. Staples, R.C. and G.H. Toennissen (eds.). pp. 321-334. Willey, New York.
- Stavarek, S.J. and D.W. Rains. 1985. Effect of salinity on growth and maintenance costs of plant cells. *In*, Cellular and Molecular Biology of Plant Stress. Key, J.L. and T. Kosuge (eds.). pp. 129-143. Alan R. Liss, Inc. New York.
- Storey, R. and R.G. Wyn Jones. 1977. Quaternary ammonium compounds in plant in relation to salt resistance. *Phytochemistry* 16: 447-453.
- Tal, M., H. Heikin and K. Dehan. 1978. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato; Responses of callus tissue of *Lycopersicon esculentum* L. *peruvianum* and *Solanum pennelli* to high salinity. *Z. Pflanzenphysiol.* 86: 231-240.
- Watad, A.A., L. Reinhold and H.R. Lerner. 1983. Comparison between a stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and the wild type. *Plant Physiol.* 73: 624-629.
- Yeo, A.R. 1983. Salinity resistance; Physiologies and prices. *Physiol. Plant.* 58: 214-222.
- Yemm, E.W. and E.C. Cocking. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* 80: 209-213.
- Zachary, S.W. and B. Brent. 1974. Isoperoxidases activity and induction in cultured tissue of wild carrot; A comparison of proembryos and embryos. *Plant Physiol.* 31: 73-75.

(1993. 2. 22 接受)