

담배(*Nicotiana tabacum* L. cv. BY4)캘러스로부터 카드뮴 저항성 세포주의 선발

오승철 · 소응영 · 조덕이¹ · 양덕춘^{2*}

전북대학교 생물학과, ¹우석대학교 생물학과, ²한국인삼연초연구원

Selection of Cadmium Resistant Cell Line from Calli of *Nicotiana tabacum* cv. BY4

OH, Seung Cheol · SOH, Woong Young · CHO, Duck Yee¹ · YANG Deok Chun^{2*}

Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea: ¹Department of Biology, Woosuk University, Chonbuk, 565-800, Korea: and ²Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea. *Corresponding author.

This study was carried out to select cadmium resistant cell lines from leaf-derived calli of diploid and haploid of *Nicotiana tabacum* cv. BY4, for understanding adaptation mechanism of plants in cadmium contaminated environment. Suspended cell clumps were plated onto selection medium containing 0 to 2,000 μM cadmium. Cadmium resistant colonies were formed on the selection medium after 3 or 4 weeks of culture. The minimum inhibition concentration (MIC) of cadmium on colony formation were 300 μM in diploid and 200 μM in haploid plants, respectively. In order to test the resistance to cadmium, selected cell line on MIC were transferred to medium containing high concentration of cadmium. The selected cell lines, especially haploid cell line, were resistant on the high concentration of cadmium. And dry weight, ash weight, and cadmium contents of cell were increased. These results indicated that the selected cell lines showed higher resistance of cadmium than control cells, and haploid plant is more resistant than diploid plant on medium with cadmium.

Key word: AAS (Atomic absorption spectrophotometry), Dry weight, Ash weight, Hardening, Plating.

카드뮴은 환경오염원으로 산업화로 인한 부산물로서 자연생태계로 유입되며 결국 인간에게 카드뮴의 만성중독을 일으켜 건강을 위협하게 되고, 식물에 있어서도 매우 유독한 것으로 알려져 있다(Vallee and Ulmer, 1972; Lee et al., 1990). 이러한 카드뮴은 식물의 탄수화물대사를 방해하며 aminoelic acid를 합성하여 클로로필의 형성을 방해하고, CO₂고정을 못하게 하며 뿌리에서 다른 이온의 흡수를 억제하는 것으로 알려져 있다(Kneer et al., 1991). 이러한 억제원인은 카드뮴이 중요한 metalloenzyme의 구리나 아연을 비가역적으로 변화시키므로 핵산 및 단백질 대사에 관여하는 생화학적과정을 교란시키기 때문이다(Vogelli-Large and Wagner, 1990). 최근 환경오염에 대한 관심이 높아지면서 각종 시설을 이용하여 중금속 물질을 토양과 폐수에서 제거하려는 연구가 진행되고 있으며, 또한 식물체를 이용하여 회수하려는 연구도 진행되고 있다. 식물체에서는 중금속에 대해서 내성을 나타내는 품종을 개발하여 사용하고자 하였으며, 주로 세포배양시 중금속 등에 대해 내성을 나타내는 세포주를 체세포변이에 의하여 일어나는 변이주 선발방법

을 이용하였다.

Bennetzen과 Adams (1984), Gupta와 Goldsbroug (1990)는 현탁배양된 토마토 세포를 사용하여 카드뮴 저항성세포주를 선발하였으며, 선발된 세포주를 사용하여 온도변화, 건조 등과 같은 외부스트레스에 대한 다양성을 연구하였다. 또한 좀더 분화된 조직을 사용한 것으로는 당근의 자엽을 이용한 체세포배 발생에 있어서 카드뮴의 영향으로 비정상적인 체세포배를 유도한다는 보고가 있다(Shin, 1996; Kamada et al., 1989).

반수체는 이배체식물에 비하여 식물체의 각 기관이 왜소하고 빈약한 것으로 알려져 있으며, 생식세포를 만들때 상동염색체의 결실로 인한 감수분열의 이상때문에 불임이 되는 등 반수체 그 자체로는 실용적가치는 없으나 유전자형이 그대로 표현형으로 나타나므로 유용형질선발을 용이하게 하고 우열성이 없으므로 돌연변이 육종에는 가장 이상적이다(Palmer and Widholm, 1975). 또한 반수체에 원하는 유용형질의 돌연변이가 나타나면 염색체를 배가하여 이배체 식물을 만들 수가 있어 한 세대에서 원하는 돌연변이개체

를 만들 수 있으며, 육종년한을 단축시킬 수 있다(Dix and Collin, 1990). 따라서 본 실험은 Oh(1994) 등에 의해 보고된 일련의 카드뮴 저항성세포주 선발에 대한 연구와 관련지어 수행하였다. 그리고 반수체의 잇점을 이용하여 카드뮴 저항성세포주를 선발하는 과정에 있어서 반수체 및 이배체식물 유래 캘러스를 병행하여 비교하였다. 즉 담배의 이배체와 반수체의 잎절편으로 유도된 캘러스로부터 카드뮴 저항성세포주를 선발하여 카드뮴에 대한 생물의 적응기작을 이해하기 위한 기초자료를 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

재료식물 및 배양세포

담배(*Nicotiana tabacum* cv BY4)의 반수체식물 유도과 증식은 Oh(1994) 등의 방법을 사용하였다. 담배 캘러스유도는 온실에서 자라고 있는 담배 이배체와 약배양에서 유도된 반수체식물의 잎으로부터 주맥을 제거하여 5 × 5 mm의 크기로 하여 sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가하고 2,4-D가 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L로 단독처리되고 pH 5.8로 맞춘 MS배지(Murashige and Skoog, 1962)에 치상하여 5회 반복실험하였다. 그리고 배양조건은 온도 25±1°C, 조도 1900 lux, 광주기는 16시간 조명하에서 실시하였다. 그 후 형성된 캘러스의 계대배양은 2,4-D와 BAP 또는 카이네티를 조합 처리한 MS배지를 사용하였으며, 현탁배양은 동일한 세포를 얻기 위하여 캘러스를 1,000 μm 나일론망에 통과시켜 세포피의 크기를 일정하게 한 후 캘러스 계대배양과 같은 동일 조건으로 처리하여 배양하였다.

카드뮴 저항성 세포주선발

카드뮴용액은 CdCl₂ · 2H₂O를 증류수로 용해하여 0.22 μm membrane filter를 이용하여 진공여과 시켰으며, polyethylene tube에 저장 보관하였다(Reese et al., 1992). 먼저 선발배지는 20 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP가 첨가된 MS고체배지를 습열멸균하여 배지가 고형화 되기전에 무균적으로 카드뮴을 0-2,000 μM의 농도별로 첨가하여 1회용 페트리디쉬에 25 mL씩 분주하였다. 그리고 평판배양(plating culture)을 위한 세포는 20 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BAP 그리고 0.8% agarose가 첨가된 MS배지에 현탁배양된 담배세포를 65 μm, 100 μm 나일론 망을 이용하여 크기를 균일하게 하고 멸균된 여과지를 사용하여 수분을 제거한 후 혼합하였다. 현탁액을 선발배지에 2 mL씩 평판배양하였다.

선발된 세포주내 카드뮴의 함량조사

건조된 카드뮴 저항성세포주를 300 mg을 자체도가니(porcelain crucible)에 취하여 회화로에 넣고 온도를 1분에 2-3°C 올리면서 540°C까지 온도를 올려 10시간 이상 회화시켰다. 회분을 10% 염산(有害金屬測定用 HCl FW : 36.46 - 松野 OSAKA)으로 녹인 후 여과지(Watman filter paper NO.42)로 불순물을 제거하고, 여과된 용액을 atomic absorption spectrophotometry(AAS)로 세포내 카드뮴함량을 측정하였다.

결 과

카드뮴 저항성세포주 선발 및 MIC 설정

100 μM에서 2,000 μM의 카드뮴을 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에 담배의 반수체 및 이배체식물의 잎절편을 치상하여 배양한 결과 카드뮴이 300 μM 이상 첨가된 배지에서는 잎절편이 백색으로 변하여 캘러스의 형성은 이루어지지 않았으나(Figure 1A), 카드뮴이 첨가되지 않은 캘러스 유도배지에서는 치상한 절편의 상처부위로부터 캘러스가 형성됨을 알 수 있었다(Figure 1B).

이배체 및 반수체의 잎절편으로부터 유도된 캘러스를 현탁배양한 다음 카드뮴이 첨가된 선발배지에 평판배양하였다. 이배체는 Cd⁺⁺ 100 μM, 200 μM에서 배양기간의 경과함

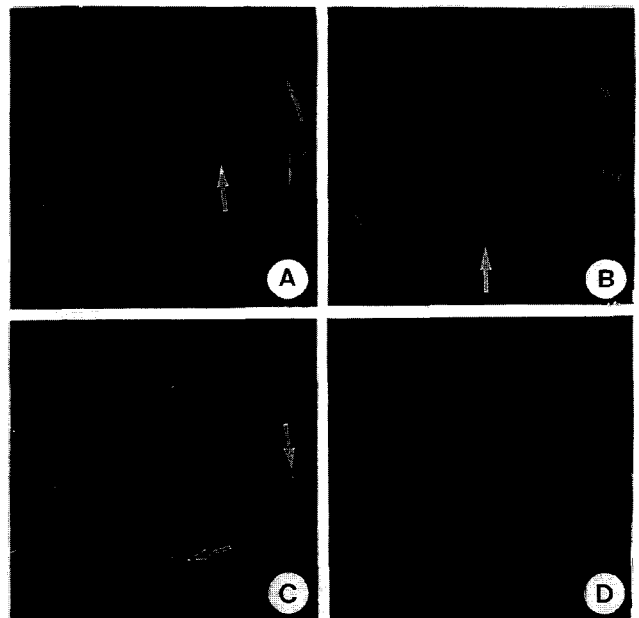


Figure 1. The toxicity of cadmium on the callus formation. A: 4-week old leaf explants on medium containing cadmium (>300 μM), B: 4-week-old leaf explants without cadmium, C-D: colony formation from plating cells on medium containing various concentration of cadmium (C: high(1,000 μM)→ D: low(100 μM)).

에 따라 형성된 colony의 수가 증가하여 배양 30일 후에는 페트리디쉬 전표면에 형성되었다. 그러나 300 μM 에서는 50%이하의 colony형성을 나타내었다. 그리고 Cd^{++} 500 μM 이상에서는 colony는 형성되지 않았다. 따라서 본실험에서는 MIC를 300 μM 로 설정하였다(Figure 1). 한편 반수체는 이 배체와는 달리 colony 출현빈도나 성장이 비교적 저조하여 배양 30일째가 되어서야 colony의 관찰이 가능하였다. Cd^{++} 100 μM 처리구에 있어서는 노란색의 colony가 보이기 시작 하였으며 그 크기는 이배체에 비해서 작았으며, 형성된 수는 배양기간이 경과함에 따라 증가하였다. 그리고 Cd^{++} 200 μM 처리구에는 배양 20일째까지는 colony가 형성되지 않았으나 배양 30일째에는 최고 40-50% 까지 되었다. 그리고 그 이상의 농도에서는 colony의 형성이 이루어지지 않았다. 때문에 본 실험에 있어서의 MIC의 설정은 Cd^{++} 200 μM 로 사용하였다(Table 1).

카드뮴 저항성 세포주의 특징

생존률

Table 1. Effect of cadmium on the formation of microcalli from plated diploid and haploid cell clump of *Nicotiana tabacum* cv. BY4 on MS medium

Cd ⁺⁺ conc. (μM)	Culture days			
	10		30	
	Diploid	Haploid	Diploid	Haploid
Control	++	+	+++	+++
100	+	-	+++	++
200	+	-	++	+
300	+	-	++	-
500	-	-	-	-
1,000	-	-	-	-
2,000	-	-	-	-

- : None(>5*) + : Low(>10) ++ : Good(>150) +++ : Excellent growth(200K)
 * : Number of colonies.

이배체는 300 μM 에서, 반수체는 200 μM 에서 각각 선발된 세포주로부터 카드뮴 저항성 정도를 조사하기 위하여 0, 500, 1,000, 2,000 μM 의 카드뮴이 첨가된 배지(hardening medium)에 계대배양하였다. 이때 세포주는 각각 약 0.03 \pm

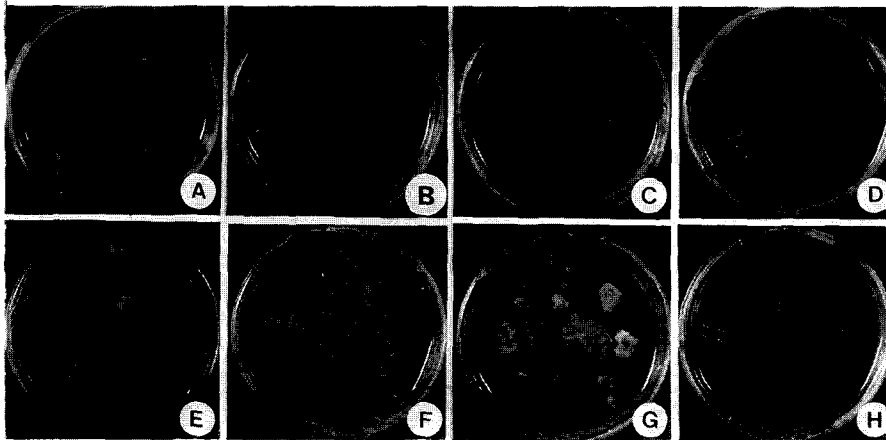


Figure 2. Callus growth from culture of normal callus and cadmium resistant callus derived from diploid plant on selection medium containing various concentration of cadmium (0-2,000 μM), A-D: normal callus, E-H: cadmium resistant callus A, E: cadmium-free, B, F: 500 μM , C, G: 1,000 μM , D, H: 2,000 μM .

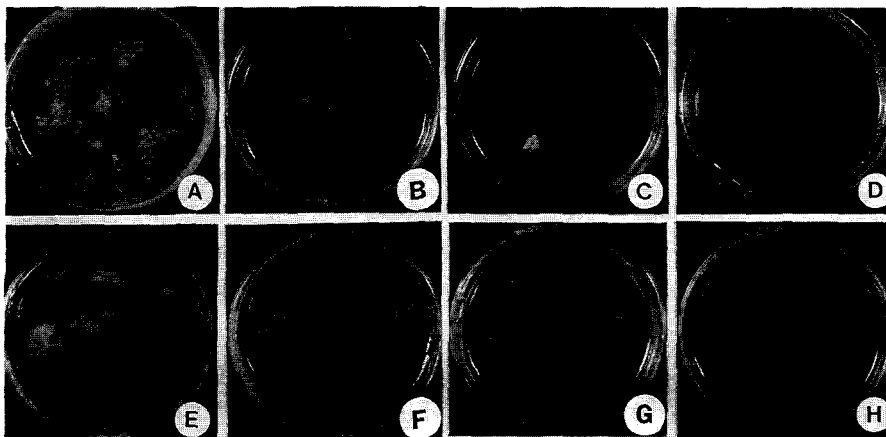


Figure 3. Callus growth from culture of normal callus and cadmium resistant callus derived from haploid plant on selection medium containing various concentration of cadmium(0-2,000 μM), A-D : normal callus , E-H : cadmium resistant callus A, E : cadmium-free, B, F : 500 μM , C, G : 1,000 μM , D, H : 2,000 μM .

0.002g 정도로 치상하였으며, 그 크기는 직경 약 1 mm가 넘지 않도록 하였다.

대조구로서 카드뮴 무첨가 배지에서 선발된 세포주를 동일 농도의 카드뮴배지에 이식하였던 바 생존률은 급격히 감소하였으며, Cd⁺⁺ 1,000 µM에서는 치상한 세포주 모두가 죽었다(Figure 2-C, D).

그러나 Cd⁺⁺ 300 µM에서 선발된 세포주의 경우는 Cd⁺⁺ 500 µM, 1,000 µM에서도 생장이 되었으며, Cd⁺⁺ 2,000 µM에서도 다소 캘러스의 상태가 회색의 색깔을 지녔지만 7.5 %가 생존하였다(Figure 2-H). 한편 반수체의 경우에는 Cd⁺⁺ 200 µM에서 일차 선발한 세포주를 이배체와 동일한 방법으로 처리하였던 바(Figure 3), 대조구보다 카드뮴배지에서 선발된 캘러스가 현저한 카드뮴 저항성을 나타내었다(Figure 3E-H). 특히 Cd⁺⁺ 500 µM, Cd⁺⁺ 1,000 µM도 100%의 생존률을 보였으며 Cd⁺⁺ 500 µM에서는 대조구보다 약 4배, 1,000 µM에서 이배체보다도 약 1.2배, 그리고 Cd⁺⁺ 2,000 µM에서는 24.0% 정도로 약 4.8배의 생존율이 높았다(Figure 4A). 또한 이배체와 반수체식물 공히 카드뮴배지에서 선발된 세포주는 생존기간에 있어서도 차이가 있었는데 대조구의 경우는 카드뮴배지에 배양할 경우 배양 30일째가 되면 갈변되어 고사하지만, 카드뮴배지에서 선발된 세포주는 생존기간이 4개월 이상되는 것도 있었다.

생중량

이배체의 경우 카드뮴첨가배지에서 선발된 세포주를 동일배지로 옮긴 경우 14.86 ± 1.81 g의 높은 증식을 보였다. 그러나 카드뮴이 고농도로 첨가된 500 µM 이상의 처리구에서는 모두 성장이 정지되었고 결국 괴사했다. 반면에 Cd⁺⁺ 300 µM에서 선발된 세포주를 카드뮴 무첨가 배지로 옮겼을 경우 10.95 g의 성장을 보였으며, 맑은 연두색을 띄었다. 또한 Cd⁺⁺ 500 µM에서도 3.65 g의 성장을 보였으며, 어두운 연두색을 띄고 성장이 왕성한 것 중에는 회색빛을 띤 부분이 나타났다. Cd⁺⁺ 1,000 µM에서는 2.30 g의 성장을 나타내었으며, 이들 캘러스도 마찬가지로 군데군데 회색이 보였다. Cd⁺⁺ 2,000 µM에서는 배양초기에만 성장하여 0.32 g의 생중량을 나타내었다. 한편 반수체의 경우 Cd⁺⁺ 200 µM에서 선발된 세포주를 카드뮴 무첨가배지로 옮겼을 경우 12.95 g의 증식을 보였으며, 세포는 이배체에 비해서 갈색을 띄었다. Cd⁺⁺ 500 µM에서는 5.49 g의 성장을 보여 이배체보다 양호하였고, Cd⁺⁺ 1,000 µM에서는 4.04 g의 생중량을 성장을 나타내었으며, 세포는 어두운 노란 연두색을 띄며 군데군데 회색빛을 띄었다. 또한 Cd⁺⁺ 2,000 µM에서도 0.53 g의 성장을 나타내었으며, 세포의 색깔은 어두운 노란색을 띄었다(Figure 4B).

건조중량

각각의 MIC에서 선발된 세포주를 일정량(10 g fresh

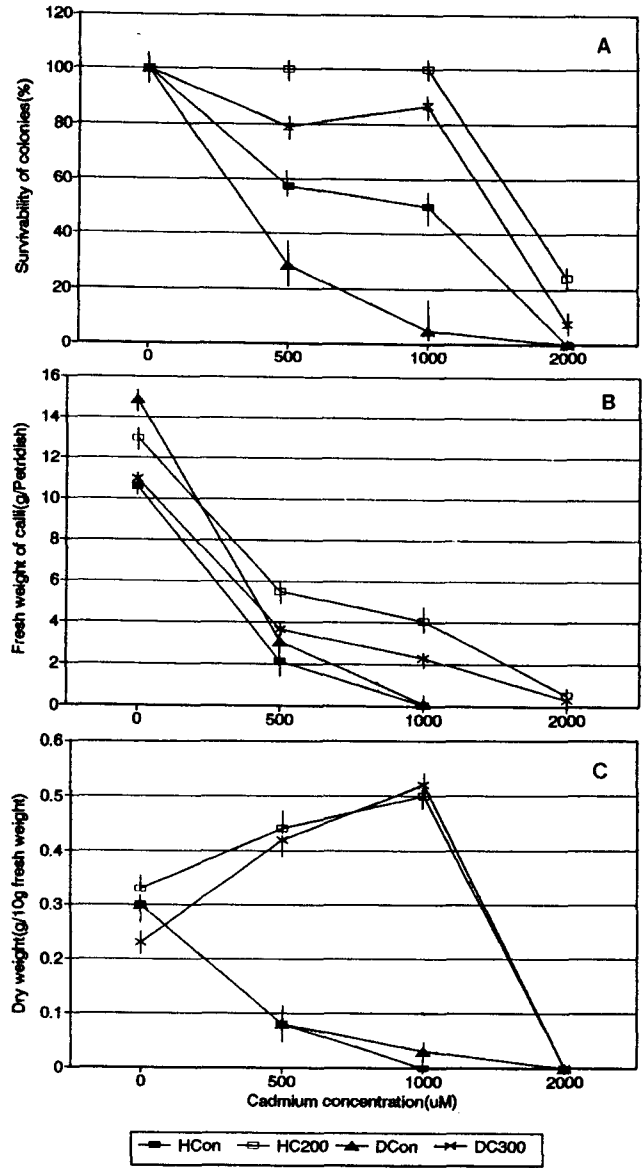


Figure 4. Effect of cadmium on the survivability, growth and dry weight of haploid and diploid calli on the cadmium media, D: callus derived from leaf of diploid plant, H: callus derived from leaf of haploid plant, C: cadmium, Con: cadmium-free, Data represent the mean ± S.E. of five independent experiments.

weight)으로 채취한 후 건조시켰을 경우, 카드뮴이 처리되지 않은 배지에서 선발된 세포주를 대조구로 옮긴 것을 기준으로 해서 선발된 세포주의 건조중량을 비교 측정하였다. 이배체는 Cd⁺⁺ 300 µM에서 선발된 세포주를 각각 고농도의 카드뮴 첨가배지에 옮겨 경화시킨 후 측정된 건조중량은 0.23 g으로 대조구의 건조중량 0.30 g보다는 적었으나 Cd⁺⁺ 1,000 µM에서 경화된 세포주는 0.52 g으로 대조구 건조중량보다 2배가량 증가하는 경향을 보였다. 한편 Cd⁺⁺ 200 µM에서 선발된 반수체의 세포주를 이배체와 마찬가지로

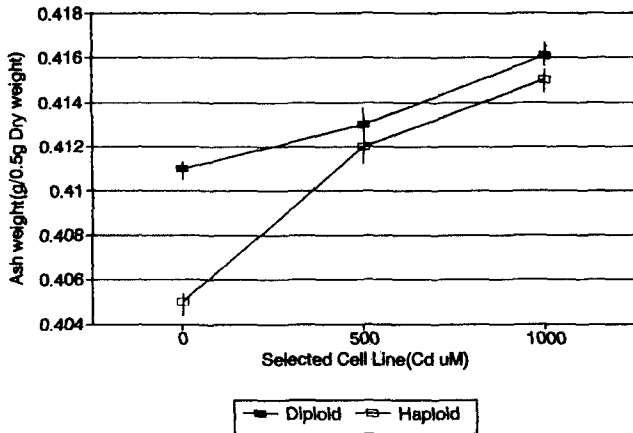


Figure 5. Ash weights from callus of selected cell line* of haploid and diploid grown on medium various concentration of cadmium. * : cadmium resistant cell line, Data represent the mean \pm S.E. of five independent experiments.

로 각각의 고농도의 카드뮴 첨가배지에 옮겨 경화시켰다. 이때 카드뮴 저항성세포주를 카드뮴이 첨가되지 않은 배지로 옮겼을 때 건조중량은 0.33 g으로 카드뮴처리를 하지 않은 대조구에서 대조구로 옮긴 세포주는 0.30 g보다 오히려 증가하였다. Cd^{++} 1,000 μM 에서 경화된 세포주는 0.5 g으로 대조구 건조중량보다 1.5배가량 증가하는 경향을 보였다. 즉, 생중량은 카드뮴이 고농도일수록 감소하였으나 건조중량은 식물체간에 차이를 나타내었지만 증가하는 경향을 나타내었다(Figure 4C).

카드뮴 함량

선발된 세포주내 카드뮴함량을 측정하기 위하여 회화로부터 유기물을 태운 후 남은 회분량을 회수하여 측정한 결과 대조구에서 선발된 것 보다는 카드뮴이 고농도로 함유된 경화배지에서 선발된 이배체와 반수체 세포주의 회분량은 증가하였다(Figure 5). 각각의 카드뮴농도에서 선발된 세포주를 0.5 g 채취하여 atomic absorption spectrophotometry (AAS)를 사용하여 선발된 세포주내에 있는 카드뮴함량을 측정하였던 바, 이배체는 카드뮴이 첨가되지 않은 배지에서 선발된 세포주보다는 Cd^{++} 500 μM , Cd^{++} 1,000 μM 에서 선발된 세포주에서 세포주내 카드뮴의 함량이 높았다. 이러한 경향은 반수체에서도 마찬가지로 카드뮴이 고농도에서 선발된 것 일수록 세포주내 카드뮴의 함량은 높았다(Figure 6).

고 찰

이배체와 반수체의 잎절편으로부터 유도된 캘러스를 카드뮴이 농도별로 처리된 선발배지에 평판배양하였던 바 카

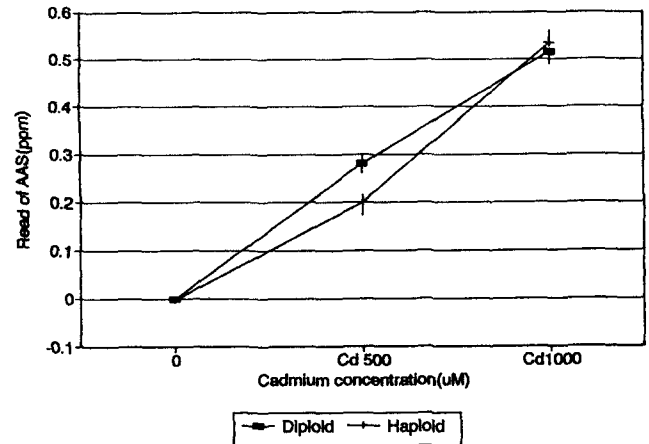


Figure 6. Cadmium contents in haploid and diploid calli measured by atomic absorption spectrophotometry (AAS), Data represent the mean \pm S.E. of five independent experiments.

드뮴의 농도가 증가 할수록 형성된 colony의 크기, 형성빈도가 저조함을 알 수 있었다. 그러나 카드뮴이 첨가된 배지에서 선발된 세포주를 고농도의 카드뮴이 포함된 배지에서 경화하였을 때 이배체는 대조구에서 선발된 세포주보다도 생존율이 높았다. 그 이유는 세포가 카드뮴에 대한 스트레스에 대하여 저항을 나타내어 생존율이 증가되었으리라 사료된다. 특히 반수체는 이배체와 달리 Cd^{++} 2,000 μM 에서 이배체식물 보다는 약 3배의 생존율을 나타내었다. 이러한 경향은 이배체와 반수체간에 세포가 스트레스에 대해서 반응하는 정도가 달라진 결과라고 사료된다. 본 연구실에서는 반수체는 이배체와 비교하여 각 기관이 왜소하였는데 이들 두 식물체의 잎절편을 배양하여 캘러스로부터 식물체분화 과정에서 일어나는 생리적 차이를 비교하였을 때에도 차이가 있음을 보고한 바 있다(Oh et al., 1994). 이러한 생리적 차이 때문에 카드뮴 처리에 의한 반응에도 차이가 있으리라 사료된다. 그리고 카드뮴의 농도에 따라 colony의 형성이 줄어든 이유는 카드뮴에 의한 독성의 효과라 사료되며, Huang과 Goldsbrough (1988)의 보고와 일치한다. 그 결과 MIC는 이배체경우 카드뮴 단독처리시 300 μM 이었고, 반수체는 200 μM 이었다. Jackson (1987) 등은 당근의 경우 125 μM 에서 과사됨을 보고하였고, Bennetzen과 Admas (1984)는 토마토에서는 50 μM 이었으며, 담배의 현탁배양시에는 300 μM 에서 대부분의 세포는 갈변되어 죽는다고 보고하고 있다. 그러나 Kamada (1989) 등은 기내에서 발아된 당근의 정단 분열조직을 배양하여 체세포배 발생에 있어서 카드뮴이 500 μM 에서는 40% 정도 이루어지나 750 μM 에서는 모두 죽는다고 보고하였다. 이러한 결과는 카드뮴으로 인한 독성의 효과뿐만 아니라 식물재료의 생리적상태, 선택방법, 배양절편, 배양방법 그리고 선발방법의 차이라고 사료되며 앞으로 연구가 수행되어야 할 것이다. 또한 Huang과

Goldsbrough (1989)는 담배로, Gupta와 Goldsbrough (1990)는 토마토를 재료로 하여 카드뮴 저항성세포주를 선발하였으며 선발된 세포주를 열자극과 저온처리하여 선발되지 않은 세포주보다도 저항성이 있음을 보고하였다.

선발된 카드뮴 저항성세포주를 고농도의 카드뮴배지에서 경화한 경우 세포주로부터 건조중량과 회분량은 카드뮴이 고농도로 갈수록 증가하였다. Gingas와 Sydnor (1988)는 해바라기와 포플러를 사용하여 카드뮴처리시 조직간의 건조중량과는 관계가 없다고 하여 본 실험 결과와 차이를 나타내었다. 식물은 중금속의 독성에 대하여 그들 자신을 방어할 수 있는 다양한 방어기작들이 있다. 이러한 방어기작중 하나는 저항성을 띤 개체군이 여러 오염원 중에서 금속으로 인한 오염된 서식지에서 생존하기 위해 채택되었을 것이며, 이러한 방어기작으로는 금속이온이 식물속에 들어오는 것을 방어하거나, 세포내에서 해독(detoxification)되는 경우, 금속이온의 흡입을 감소시키거나, 활발한 유출에 의해서 낮은 세포내 농도를 유지하여, 액포속으로 또는 금속이온을 리간드로 결합시켜 그 이온을 민감한 세포의 대사로 부터 분리시킴으로 저항을 띄도록 한다는 것이다(Tomesett et al., 1992). 본 연구에서도 AAS를 사용하여 측정된 카드뮴 저항성세포주내 카드뮴함량도 비교적 높음을 알 수 있었다. Vogeli-Large와 Wagner (1990)는 카드뮴처리시 카드뮴을 액포로 전달하는 수용체로서 작용하는 PCs (phytochelatins)가 액포내에 위치하는 바 세포내 카드뮴함량 역시 증가된다 하였으며, 본 실험의 결과와도 일치됨을 알 수 있다. 이러한 연구로 기대되는 효과로는 이차대사산물 생산율을 높이기 위해 카드뮴과 같은 중금속이 abiotic elicitor로서 사용될 수 있으며, 식물체의 영양적 질을 향상시킬 뿐만 아니라 공업지대와 같은 오염지역, 간척지와 같은 불량토양, 제조체 저항성, 그리고 반수체를 이용한 육종연구 등에 응용될 수 있으리라 기대된다.

적 요

담배(*Nicotiana tabacum* cv. BY4)의 이배체식물과 담배의 약으로부터 유도된 반수체식물의 잎절편을 사용하여 2.4-D를 단독처리하여 캘러스를 유도하였다. 캘러스중식은 이배체에서는 2.0 mg/L 2.4-D와 1.0 mg/L 카이네틴의 조합처리구에서, 반수체의 경우에 있어서는 2.0 mg/L 2.4-D와 0.1 mg/L BAP 조합처리구에서 실시하였으며, 현탁배양도 동일 조건으로 실시하였다. 현탁배양 세포괴를 배양 15-20일째가 되면 0.8% low melting agarose와 혼합하여 카드뮴이 0-2,000 μM 의 농도로 처리된 선발배지에 평판배양하여 카드뮴저항성 colony(cell clump)를 조사관찰하였다. 그 결과 본 실험에서는 이배체는 세포의 성장에 있어서 최하저해농도(MIC : Minimum Inhibition Concentration)는 Cd^{++} 300 μM 이었으며

반수체는 Cd^{++} 200 μM 이었다. 이때 반수체 및 이배체의 MIC에서 선발된 세포주를 카드뮴 500, 1,000, 2,000 μM 의 농도로 옮겨 경화시킨 후 카드뮴저항성을 선발하였고 그 특성을 조사하였다. 그 결과 카드뮴 저항성을 띤 반수체 및 이배체유래 캘러스의 경우에는 각각 카드뮴의 농도가 증가할수록 생중량은 감소하였으나, 건조중량은 오히려 증가하였다. 그리고 각각 선발된 세포주내의 카드뮴의 함량을 AAS를 사용하여 측정하였던 바, 카드뮴의 농도가 높을수록 캘러스에 축적된 카드뮴의 양이 높게 나타났다.

인용 문헌

- Bennetzen JL, Adams TL (1984) Selection and characterization of cadmium-resistant suspension cultures of the wild tomato *Lycopersicon peruvianum*. Plant Cell Reports 3: 258-261
- Dix PJ, Collin HA (1990) Culture systems and selection procedures. In PJ Dix, ed, Plant Cell Line Selection. VCH pp 3-18
- Gingas VM, Sydnor TD (1988) Effects of simulated acid rain on cadmium mobilization in soils and subsequent uptake and accumulation in poplar and sunflower. J Amer Soc Hort Sci 113: 258-261
- Gupta SC, Goldsbrough PB (1990) Phytochelatin accumulation and stress tolerance in tomato cells exposed to cadmium. Plant Cell Reports 9: 466-469
- Huang SC, Goldsbrough PB (1988) Cadmium tolerance in tobacco cell culture and its relevance to temperature stress. Plant Cell Reports 7: 119-122
- Jackson PJ, Unkefer CJ, Doolen JA, Watt K, Robinson NJ (1987) Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycines: Its role in cadmium resistance in plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 84: 6619-6623
- Kamada H, Kobayashi K, Kiyosue, Harada (1989) Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. In Vitro Cell Dev Biol 25: 1163-1166
- Kneer R, Zenk MH (1991) Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. Phytochemistry 31: 2663-2667
- Lee KS, Kang SW, Kim YH, Kim EA, Kim KH, Choi YK (1990) Cadmium detoxification mechanism of Cd-resistant *Bacillus* sp. isolated from industrial sewage. Korean J Limnology 23: 115-127
- Nakata K, Kurihara (1972) Competition among pollen grains for haploid tobacco plant formation by anther culture. Japan J Breed 22: 92-98
- Oh SC, Soh WY, Cho DY, Yang DC (1994) Enzyme activity in plant regeneration from diploid and haploid calli of *Nicotiana tabacum* cv BY4. Korean J Plant Tissue Culture 21: 333-339
- Palmer JE, Widholm JM (1975) Characterization of carrot and tobacco cell cultures resistant to *p*-fluorophenylalanine. Plant Physiol 56: 233-238

- Reese RN, White CA, Winge DR** (1992) Cadmium-sulfide crystallites in CD-(γ EC)_nG peptide complexes from tomato. *Plant Physiol* **98**: 225-229
- Shin EK** (1996) Effects of cadmium on somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured cells of *Daucus carota* L. M.S. thesis, Chonbuk National University, Chonju.
- Tomsett AB, Sewell AK, Jones SJ, Miranda JR, Thurman BA** (1992) Metal binding proteins and metal-regulated gene expression in higher plant. *In* : J. L. Wary. ed, Society for Experimental Biology Seminar

- Series 49: Inducible Plant Proteins. Cambridge University Press, 1992, pp. 1-24
- Vallee BL, Ulmer DD** (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann Rev Biochem* **41**: 91-128
- Vogelli-Large R, Wagner GJ** (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol* **92**: 1086-1093

(1997년 9월 23일 접수)