

# 토양 중 고농도 카드뮴에 노출된 *MuS1* 형질전환 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)의 생리적 반응 및 카드뮴 축적: 식물학적 오염토양정화를 위한 형질전환 식물 탐색

정윤화 · 김영남<sup>1</sup> · 김권래<sup>2</sup> · 김계훈\*

서울시립대학교 환경원예학과, <sup>1</sup>링컨대학교 생태학과, <sup>2</sup>경남과학기술대학교 농학한약자원학부

## Physiological Response and Cadmium Accumulation of *MuS1* Transgenic Tobacco Exposed to High Concentration of Cd in Soil: Implication to Phytoremediation of Metal Contaminated Soil

Yoon-hwa Jeung, Young-Nam Kim<sup>1</sup>, Kwon-Rae Kim<sup>2</sup>, and Kye-Hoon Kim\*

Department of Environment Horticulture, The University of Seoul, Seoul 130-743, Republic of Korea

<sup>1</sup>Department of Ecology, Lincoln University, P.O. Box 84, Lincoln 7647, Christchurch, New Zealand

<sup>2</sup>Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju, 660-758, Republic of Korea

The objective of this study was to understand the physiological response and cadmium accumulation of *MuS1* transgenic tobacco exposed to high concentration of Cd in soil. For this, a pot experiment was carried out in a greenhouse for a month, with two lines of *MuS1* transgenic tobaccos (S4 and S6) and non-transgenic tobacco cultivated in the soils spiked at three different Cd concentrations (0, 60 and 180 mg kg<sup>-1</sup>). Both transgenic and non-transgenic tobacco showed visible toxic symptoms such as chlorosis and leaf roll as treated concentration increased. The net photosynthetic rates of *MuS1* plants (S4 and S6) exposed at 180 mg kg<sup>-1</sup> Cd were 6.3 and 7.7  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , being higher than those of the non-transgenic plant (4.8  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Values of stomatal conductance of *MuS1* transgenic plants (0.05 and 0.008 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) were also higher than those of non-transgenic plant (0.03 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). In addition, fresh and dry weights of *MuS1* transgenic plants were heavier than those of non-transgenic plant. Likewise, *MuS1* transgenic plants appeared to be better physiological performance than non-transgenic tobacco when exposed at high concentration of Cd in soil. With regard to metal accumulation, *MuS1* transgenic tobaccos accumulated more Cd in their roots than non-transgenic tobacco implying that *MuS1* transgenic tobacco is suggested to be used for phytostabilization of heavy metals.

**Key words:** *MuS1*, Transgenic plant, Phytoremediation, Cadmium, Tobacco, Immobilization.

### 서 언

지금까지 중금속 오염토양을 복원하는 방법으로 다양한 물리·화학적 방법이 주로 사용되어 오고 있다. 그러나 물리·화학적 방법은 처리에 있어 고가의 장비와 기술이 요구되며, 상대적으로 낮은 농도로 광범위하게 오염된 지역에 적용하기에는 경제적·환경적 측면에서 단점을 안고 있다 (Ok et al., 2004). 반면 식물정화공법 (phytoremediation)은 비

용이 저렴하고 환경친화적이며, 비교적 낮은 농도로 오염된 넓은 부지를 대상으로 토양을 복원할 수 있다는 장점이 있어 현장 적용을 위한 연구 및 산업화가 진행되고 있다 (Kim et al., 1999).

이에 따라 phytoremediation에 효과적인 식물을 탐색하기 위한 연구들이 많이 진행되어, 지금까지 45과 400여 종의 중금속 고축적식물 (hyperaccumulator)들이 동정되었다 (Baker et al., 2000). 그러나 이러한 고축적 식물들은 오염 토양 내에서 생장속도가 느리고 생체량 (bio-mass)이 적어, 식물 체내에 고농도의 중금속을 축적함에도 불구하고 오염도 저감에는 큰 효과를 보지 못하고 있다. 따라서 최근에는 유전

접수 : 2013. 1. 16 수리 : 2013. 2. 5

\*연락처 : Phone: +82222102605

E-mail: johnkim@uos.ac.kr

공학기술을 통한 형질전환 식물을 이용하여 기존 phytoremediation의 한계를 극복하고자 하는 연구들이 진행되고 있다. 예를 들면, *MT1*, *gshII*, *OASTL*, *ZntA* 등의 형질전환 식물이 기존의 비형질전환 식물보다 카드뮴에 더 강한 내성을 지니고 있으며 생육도 훨씬 양호한 것으로 보고되었다 (Pan et al., 1994; Zhu et al., 1999; Lee et al., 2003; Kawashima et al., 2004). 최근에 Kim et al. (2011b)은 고온 스트레스, 염 스트레스, 중금속 스트레스에 저항성을 발현하는 *MuS1* (multiple stress responsible gene I) 유전자로 형질전환 시킨 담배 (Seo et al., 2010)를 이용하여 배지실험과 수정재배 실험을 실시한 결과, *MuS1* 형질전환 담배가 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  농도조건에서 형질전환 되지 않은 wild-type 담배보다 발아 및 생육이 좋고, 카드뮴 독성에 더 높은 저항성을 나타낸다고 보고하였다. 그리고 카드뮴에 대한 저항성은 *MuS1* 형질전환 담배에서 CAT와 APX 같은 항산화효소 활성도가 높아지면서 발현되는 것으로 확인할 수 있었다 (Kim et al., 2011a). 또한 그들의 실험에서 *MuS1* 형질전환 담배는 wild-type 담배보다 상대적으로 높은 농도의 카드뮴을 뿌리에 축적하는 양상을 보였는데, 이는 *MuS1* 형질전환 담배의 뿌리가 지상부로의 카드뮴 이동을 억제시키거나 근권부에 카드뮴을 고정시키는 역할을 하는 것으로 설명하였다 (Kim et al., 2011b).

따라서, 본 연구는 배지 발아실험과 수정재배를 통해 밝혀진 *MuS1* 형질전환 담배의 카드뮴 저항성 및 축적 양상을 보다 실증적으로 접근하고자, *MuS1* 형질전환 담배 (line 4, line 6)를 카드뮴 오염토양에 노출시켜 토양에서의 성장 및 생리활성변화, 카드뮴 흡수 특성을 알아보고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

**공시토양 및 공시식물** 본 실험에 사용한 토양은 서울 시립대학교 내 배봉산에서 채취한 것이다. 토양을 채취한 후 이물질을 제거하고 2 mm로 체거름 한 후 건조하여 실험에 사용하였다. 토양의 물리성을 개량하기 위하여 토양, 원

예용상토, 펄라이트를 부피 기준으로 2:1:1로 혼합하여 사용하였다. 공시토양의 이화학적 특성은 Table 1과 같았다. 공시토양에서 재배하는 공시작물에 양분을 공급하기 위한 비료 사용량은 연초용 표준시비처방기준 (NAAS, 2006)으로 계산한 양을 전량 기비로 처리하였다.

토양 중 카드뮴 처리를 위하여  $\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 이용하여 만든  $\text{Cd}^{2+}$  수용액 (84, 255  $\text{mg L}^{-1}$ )을 이용하였고, 토양 300 g을 pot (직경, 12 cm  $\times$  높이, 10.5 cm)에 충전한 다음, 카드뮴 용액 250 mL를 토양이 충전된 pot에 분주하고 30일간 안정시킨 후 토양을 다시 균일하게 섞어 재배실험에 사용하였다. 최종 처리 농도는 두 수준으로 카드뮴 전함량이 60, 180  $\text{mg kg}^{-1}$ 이 되도록 각각 처리하였다.

본 실험에 사용한 공시식물은 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)로서 *MuS1* 유전자로 형질전환 시킨 담배 [S4 (line 4), S6 (line 6)]와 대조구로 공백터만 삽입한 담배 [Control (LA-14)]를 실험재료로 사용하였다. 시험에 이용한 모든 담배모는 원예용 상토에 파종한 시점으로부터 60일 간의 육묘공정을 거친 것으로 크기가 균일한 것을 이용하였다. 공시식물을 오염토양 300 g을 충전된 pot 당 한 주 (株)씩 정식하고 pot를 완전 임의 배치하였으며 각 식물 종류별 그리고 카드뮴 처리 농도별 4반복으로 재배실험을 진행하였다. 정식한 식물을 온실 내에서 30일 간 재배한 후 식물체 및 토양시료를 채취하여 분석에 이용하였다.

**생육조사** 생육조사는 정식한 식물을 30일 동안 재배한 후 지상부의 길이 (shoot length), 생체중 (fresh weight), 건물중 (dry weight)을 측정함으로써 수행하였다. 생체중은 식물체를 뿌리, 줄기, 잎으로 구분하여 각 부위별로 측정하였다. 건물중은 생체중을 측정된 식물체를, 65°C의 건조기 (drying oven)에서 3일 동안 건조시킨 후 측정하였다.

**생리활성분석** 순광합성률 (Net Photosynthetic rate) 각 식물의 순광합성 능력은 휴대용 광합성 측정기 (LI-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, USA)를 사용하여 광 포획점에 가까운 1,000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광도에서 측정하였다. 광합성 측정 시 leaf chamber의 내부 온도는 25°C,  $\text{CO}_2$ 농도는  $\text{CO}_2$  injector system을 이용하여 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 로 유지하였다. 순광합성량은 Caemmerer and Farquhar (1981)의 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$P_N = \frac{U_e (C_e - C_d)}{100_s} C_c E$$

$P_N$ : Net photosynthesis ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ),

$U_e$ : Mole flow rate of air entering the leaf chamber ( $\mu\text{mol s}^{-1}$ ),

$C_c$ : Mole fraction of  $\text{CO}_2$  in the leaf chamber

**Table 1. Selected physicochemical properties of the soil used.**

| Parameter                               | Component  |
|---|------------|
| pH (1:5)                                | 5.6        |
| Organic matter (%)                      | 3.3        |
| CEC ( $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ) | 14.9       |
| Soil fractions                          |            |
| Sand (%)                                | 59.3       |
| Clay (%)                                | 17.4       |
| Silt (%)                                | 23.3       |
| Texture                                 | Sandy loam |
| Total cadmium ( $\text{mg kg}^{-1}$ )   | 2.1        |

( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ air}$ ),

$C_c$ : Mole fraction of  $\text{CO}_2$  entering in the leaf chamber

( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ air}$ ),

$s$ : Leaf area ( $\text{cm}^2$ ),

$E$ : Transpiration ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

수분이용효율과 기공전도도 수분이용효율은 다음 식으로 계산하였다 (Al-Amoudi et al., 2002). 여기서 광합성 능력 ( $P_N$ )과 증산량 (Tr)은 휴대용 광합성 측정 기기 (LI-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, USA)를 이용하여 측정하였다.

$$\text{WUE} = R_N/\text{Tr}$$

WUE: Water use efficiency ( $\mu\text{mol CO}_2 / \text{mmol H}_2\text{O}$ ),

$R_N$ : Photosynthetic rate ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ),

Tr: Transpiration rate ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

광합성 시 기공세포에서 대기로의 수분확산 속도의 크기를 의미하는 기공 전도도 (stomatal conductance)는 conductance 값을 이용하여 구하였다. 보통 기공전도도의 크기는 광도, 수증기압포차,  $\text{CO}_2$ 농도, 기온, 상대습도 등과 같은 환경인자의 변화에 영향을 받는다 (Hinckley and Braatne, 1994). 포화광량은  $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 으로 설정하여 기공전도도의 값을 측정 후 비교한 값으로 나타내었다.

엽록소 함량 (Chlorophyll content)과 카로티노이드 함량 카드뮴 독성이 *MuS1* 형질전환 담배의 엽록소 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 엽록소 *a*와, 엽록소 *b* 함량, 엽록소 *a/b*, 그리고 카로티노이드 (carotenoid)의 함량을 조사했다. 엽록소 함량 [(엽록소*a*, 엽록소*b*와 총 엽록소 함량 ( $a + b$ )] 과 카로티노이드 함량을 분석하기 위해 잎 0.2 g을 아세톤 (80%) 8 mL로 냉암소에서 7일간 침출한 후 UV/VIS Spectrometer (UV/VIS - 5420, Shimadzu, Japan)를 이용하여 파장 663, 645와 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 엽록소 함량은 다음 식을 이용하여 계산하였다 (Arnon, 1949; Lichtenthaler, 1987).

$$\text{Chlorophyll } a = 12.7 A_{663} - 2.69 A_{645},$$

$$\text{Chlorophyll } b = 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663},$$

$$\text{Total Chlorophyll } (a + b) = 20.29 A_{645} + 8.02 A_{663},$$

$$\text{Total Carotenoid} = (1000 A_{470} - 1.82 \text{ chl}_a - 85.02 \text{ chl}_b)/198.$$

**식물체 내 카드뮴 함량 분석** 식물체 내 카드뮴의 농도를 측정하기 위해서 식물체를 뿌리, 줄기, 잎으로 나누어 Westerman (1990)의 방법으로 식물체를 전처리한 후 건조 시료 0.5 g을 분해용 flask에 넣고 conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mL와 60%  $\text{HClO}_4$  10 mL를 첨가하여 가열판 (hot plate,  $350^\circ\text{C}$ )에서 분

해하였다. Cresser and Parsons (1979)의 방법에 따라 분석 중 시료가 투명해지면 가열을 멈추고, Whatman No.42 여과지로 여과한 후 100 mL로 희석하여 원자흡광분광광도계 (AA - 6800, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분해액 내의 카드뮴 함량을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**카드뮴 노출 농도에 따른 생육특성** 카드뮴 처리에 따른 가시적 피해 증상은  $180 \text{ mg kg}^{-1}$  처리에서는 5일째에,  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  처리에서는 9일째에 각각 나타나기 시작했다. 초기의 피해 증상은 조직의 괴사 (necrosis)가 주를 이루었고, 식물체의 중위엽부터 시작되어 상위엽으로 확장되었다. 시간이 갈수록 카드뮴을 처리한 식물체들은 황백화 (chlorosis) 및 잎 말림 (leaf roll) 현상을 보였다. 생육 후반부로 갈수록 *MuS1* 형질전환 담배의 피해증상은 비형질전환 담배에 비해 줄어든다고 보고한 Kim et al. (2011b)의 결과와는 달리, 본 연구에서는 생육후기에 형질전환 여부에 따른 가시적 피해의 차이는 나타나지 않았다. 이는 수경재배와 토양재배의 차이와 본 연구에서 설정한 고농도의 카드뮴 농도가 원인인 것으로 생각되었다.

비형질전환 담배와 *MuS1* 형질전환 담배 (S4, S6) 모두 카드뮴 농도가 증가할수록 지상부 길이 (shoot length), 생체중 (fresh weight) 및 건물중 (dry weight)이 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Table 2). 지상부 길이는 카드뮴의 처리 여부와 관계없이 *MuS1* 형질전환 담배가 비형질전환 담배에 비해 높게 나타나, *MuS1* 유전자가 담배의 지상부 길이 생장에 긍정적 영향을 준다고 볼 수 있었다. 이는 카드뮴을 처리하지 않은 실험구에서 *MuS1* 형질전환 담배 (S6)가 대조구 담배보다 지상부 길이가 길었다는 Kim et al. (2011b)의 연구 결과와 일치하였다. 식물체 line 간 생체중 (잎+줄기)의 변화를 살펴보면, 카드뮴 처리구에서 *MuS1* 형질전환 담배 ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$  처리구, S6:  $46.0 \text{ g}$ ; S4:  $44.4 \text{ g}$ )가 비형질전환 담배 ( $43.8 \text{ g}$ )에 비해 생체중이 크게 나타났으며, 그 결과로 건물중에서도  $180 \text{ mg kg}^{-1}$  처리에서 *MuS1* 1 형질전환 담배인 S6가  $4.4 \text{ g}$ 으로 가장 높게 나타났다. 하지만 통계적 유의성이 높게 나타나지는 않았다. 이와 같이 본 연구에서는 형질전환에 따른 생육의 차이가 카드뮴 처리에 따라 높은 유의성을 보이지 않아 생육조사만으로 *MuS1* 형질전환 담배의 카드뮴 내성을 확인하기는 어려웠다.

**형질전환 담배의 카드뮴 노출에 따른 생리활성 반응** 전체적으로 카드뮴 처리농도가 높아질수록 형질전환 및 식물체 line에 상관없이 순광합성률은 카드뮴 처리 농도가 증가할수록 감소하였다 (Fig. 1). 하지만 카드뮴 농도  $180 \text{ mg kg}^{-1}$

**Table 2. Growth of transgenic and non-transgenic tobaccos at different cadmium treatment levels.**

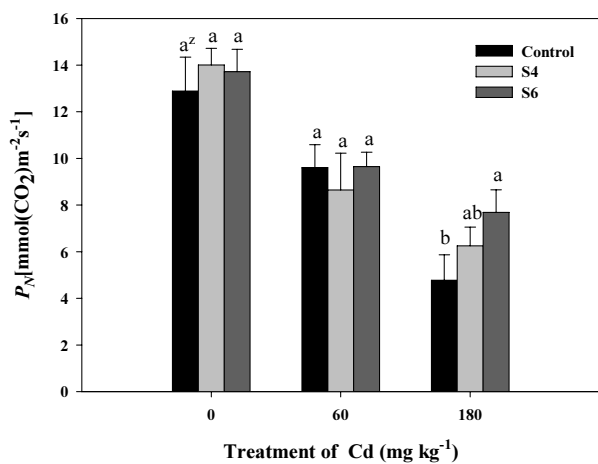
| Cd<br>(mg kg <sup>-1</sup> ) | Plant<br>(line) | Shoot lenght<br>(cm) | Fresh weight (g) |         | Dry weight (g) |        |        |
|------------------------------|-----------------|----------------------|------------------|---------|----------------|--------|--------|
|                              |                 |                      | Leaf             | Stem    | Leaf           | Stem   | Root   |
| 0                            | Control         | 43.4 b <sup>†</sup>  | 29.0 ab          | 20.2 bc | 3.7 a          | 3.1 ab | 2.7 bc |
|                              | S4              | 49.2 a               | 28.0 abc         | 21.3 ab | 3.5 a          | 3.3 a  | 2.7 bc |
|                              | S6              | 48.4 a               | 30.2 a           | 22.5 a  | 3.6 a          | 3.3 a  | 3.2 a  |
| 60                           | Control         | 39.4 c               | 25.2 d           | 18.6 c  | 3.0 b          | 2.6 c  | 2.9 ab |
|                              | S4              | 43.5 b               | 25.9 cd          | 18.6 c  | 3.0 b          | 2.7 bc | 2.8 b  |
|                              | S6              | 43.1 b               | 26.9 bcd         | 19.1 c  | 3.1 b          | 2.7 bc | 2.4 c  |
| 180                          | Control         | 32.9 e               | 20.9 e           | 13.7 d  | 2.4 c          | 1.9 de | 1.7 d  |
|                              | S4              | 34.1 de              | 18.1 f           | 12.4 d  | 2.0 d          | 1.7 e  | 1.5 d  |
|                              | S6              | 36.4 d               | 19.6 ef          | 14.1 d  | 2.2 cd         | 2.2 d  | 1.4 d  |

| Source               | Analysis of variance <sup>y</sup> |     |     |     |     |     |     |
|----------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cd treatment         | *** <sup>‡</sup>                  | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| Plant (line)         | ***                               | NS  | *   | *   | NS  | NS  | NS  |
| Cd treatment × plant | NS                                | NS  | NS  | NS  | NS  | NS  | **  |

<sup>†</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

<sup>‡</sup>\*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ; NS not significant.



**Fig. 1. Net photosynthetic rates ( $P_N$ ) of transgenic and non-transgenic tobacco treated with different cadmium concentrations. Bars indicate standard error ( $n=6$ ). Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .**

처리에서 비형질전환 담배가  $4.8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 급격히 감소한 반면, S4와 S6의 순광합성률은 각각  $6.3, 7.7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 으로 비형질전환 담배에 비하여 높게 유지되었다. 이는 고농도의 카드뮴 처리에서는 *MuS1* 형질전환 담배가 비형질전환 담배에 비해 광합성 기작에 피해를 덜 받았음을 의미한다. 일반적으로 카드뮴은 기공개폐에 영향을 주고, 엽록소의 감소를 가져와 광합성률을 떨어뜨린다. 또한, Prasad (1995)는 rubisco의 활성을 저하시키고 광합성에 관여하는 효소의 작용을 억제하여 광합성률을 떨어뜨리기도 한다고 보고하였다.

식물은 일반적으로 기공을 통해  $\text{CO}_2$ 를 흡수함과 동시에  $\text{H}_2\text{O}$ 를 방출한다. 이때 식물은  $\text{CO}_2$ 를 더 많이 흡수하려 하고  $\text{H}_2\text{O}$ 를 더 적게 소비하려고 하는데, 이러한 의미에서 식물은 증산속도를 최소화하는 반면 광합성 속도는 최대화하려고 하는 것이 최적의 기공 메커니즘이 되는 것이다. 여기서 식물의 수분이용효율 (Water use efficiency, WUE)이란 단위 엽면적 ( $\text{m}^2$ ) 당 수분소비량에 대한  $\text{CO}_2$ 흡수량의 비율을 뜻한다. 일반적으로 잎의 수분이용효율 크기는 순광합성속도의 크기에 정비례한다 (Kozłowski and Pallardy, 1997). 본 실험에서 수분이용효율은 카드뮴  $0 \text{ mg kg}^{-1}$ 과  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  처리구에서는 차이를 보이지 않았으나,  $180 \text{ mg kg}^{-1}$  처리에서는 비형질전환 담배가 가장 높았으며, 다음으로 S4, S6의 순으로 형질전환에 따른 차이가 뚜렷이 나타났다 (Fig. 2A). 이러한 결과를 보인 이유는 Fig. 1에 나타난 바와 같이, *MuS1* 형질전환 담배가 비형질전환 담배에 비해 높은 광합성률을 보였으나, 광합성률 증가와 더불어 증산속도의 증가비율이 더 크게 작용하였기 때문인 것으로 생각되었다.

기공전도도는 카드뮴의 농도가 높아질수록 전체적으로 감소하는 경향을 보였으며, 카드뮴  $0 \text{ mg kg}^{-1}$ 과  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  처리구에서는 형질전환에 따른 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 2B). 하지만 카드뮴 농도  $180 \text{ mg kg}^{-1}$  처리에서 대조구의 기공전도도가  $0.03 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 급격히 감소하였으며 S4, S6의 기공전도도는 각각  $0.05, 0.008 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 으로 대조구에 비하여 높게 유지되었다. 기공전도도의 결과는 순광합성률과 같은 경향을 보였는데, 일반적으로 광합성률이 높으면 증산속도가 높아지고 그에 따라 기공전도도도 값도 높아진다.

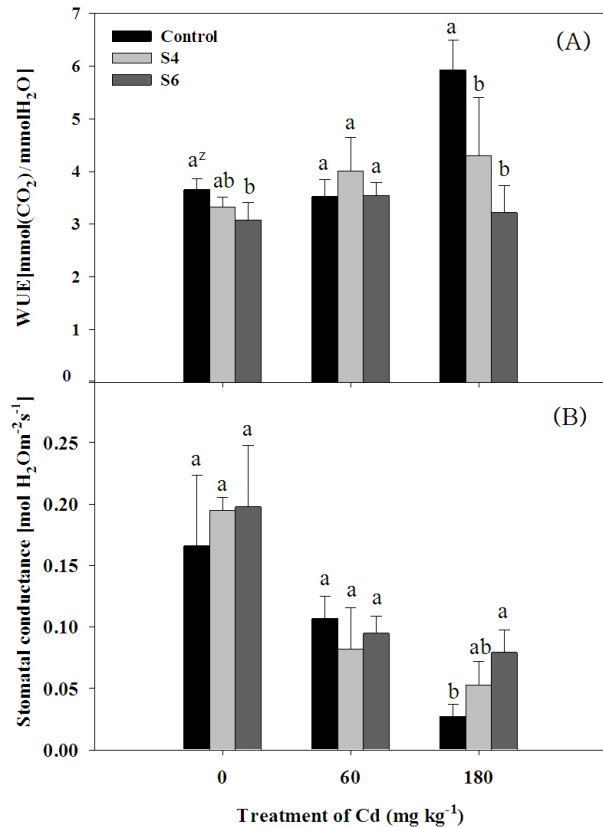


Fig. 2. Water use efficiency (A) and stomatal conductance (B) of transgenic and non-transgenic tobacco treated at different cadmium concentrations. Bars indicate standard error (n=6). Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

비형질전환 담배와 *Mus1* 형질전환 담배 (S4, S6) 모두 카드뮴 처리 농도가 증가할수록 총 엽록소 함량과 카로티노이드 (carotenoid) 함량이 통계적으로 유의하게 감소하였고, 엽록소 a/b는 증가하는 경향을 보였다 (Table 3). 형질전환에 따라서는 S4 line의 담배는 비형질전환 담배에 비해서 카드뮴에 노출되었을 때 엽록소와 카로티노이드 모두 더 감소하는 경향을 보인 반면, S6 line의 담배는 비형질전환 담배와 비슷하거나 다소 감소하는 경향을 나타냈다. 엽록소는 광합성에 있어서 빛 에너지를 일차적으로 수확하는 색소로서 식물의 광합성능력을 나타내는 지표가 되며, 일반적으로 식물이 카드뮴 스트레스를 받게 되면 엽록소가 감소한다. Stobart et al. (1985)에 의하면 이것은 카드뮴이 엽록소 생합성과정의 필수 전구물질인 5-aminolevulinic acid의 합성을 억제하고, 원 엽록소 (prochlorophyllide)의 환원을 감소시키기 때문이라고 했다. 또한, 카드뮴이 광계 (photosystems)의 엽록소 단백질 복합체에 직접적으로 영향을 주어 엽록소 함량이 줄어들기도 한다 (Krupa, 1987). Roh and Chin (2005)의 연구에서도 카드뮴을 처리한 담배에서 총 엽록소의 함량이 감소하는 결과를 보였다.

**형질전환에 따른 담배의 카드뮴 축적 양상** 수확 후 *Mus1* 형질전환 담배 (S4, S6)와 대조구 담배의 부위별 (뿌리, 줄기, 잎) 카드뮴 농도를 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. *Mus1* 형질전환 담배 (S4, S6)와 비형질전환 담배의 잎 중 카드뮴 농도는 카드뮴 처리농도가 증가할수록 축

Table 3. Chlorophyll and carotenoid contents of transgenic and non-transgenic tobacco cultivated at different cadmium treatment levels.

| Cd (mgkg <sup>-1</sup> ) | Plant (line) | Content (mg g <sup>-1</sup> freshweight) |        |            |                |            |
|--------------------------|--------------|--|--------|------------|----------------|------------|
|                          |              | Chl. a                                   | Chl. b | Total Chl. | Chl. a/b ratio | carotenoid |
| 0                        | Control      | 1.12 a <sup>†</sup>                      | 0.45 a | 1.57 a     | 2.48 d         | 0.49 a     |
|                          | S4           | 1.11 a                                   | 0.45 a | 1.56 a     | 2.50 d         | 0.48 a     |
|                          | S6           | 1.06 a                                   | 0.42 a | 1.48 a     | 2.55 cd        | 0.44 a     |
| 60                       | Control      | 0.84 b                                   | 0.30 b | 1.14 b     | 2.84 bc        | 0.38 b     |
|                          | S4           | 0.65 c                                   | 0.22 c | 0.87 c     | 3.00 ab        | 0.29 c     |
|                          | S6           | 0.67 c                                   | 0.23 c | 0.91 c     | 2.85 b         | 0.31 c     |
| 180                      | Control      | 0.41 d                                   | 0.13 d | 0.54 d     | 3.26 a         | 0.17 d     |
|                          | S4           | 0.27 d                                   | 0.08 d | 0.35 d     | 3.32 a         | 0.11 e     |
|                          | S6           | 0.40 d                                   | 0.13 d | 0.53 d     | 3.17 a         | 0.16 d     |
| Source                   |              | Analysis of variance <sup>y</sup>        |        |            |                |            |
| Cd treatment             |              | *** <sup>‡</sup>                         | ***    | ***        | ***            | ***        |
| Plant (line)             |              | *  | *      | *          | NS             | **         |
| Cd treatment × plant     |              | NS                                       | NS     | NS         | NS             | NS         |

<sup>†</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

<sup>‡</sup>\*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ; NS not significant.

**Table 4. Cadmium concentration in leaf, stem and root of transgenic and non-transgenic tobacco cultivated at different cadmium treatment levels.**

| Plant<br>(line) | Treatment of Cd (mg kg <sup>-1</sup> ) |         |         |        |         |          |        |           |          |
|-----------------|--|---------|---------|--------|---------|----------|--------|-----------|----------|
|                 | 0                                      | 60      | 180     | 0      | 60      | 180      | 0      | 60        | 180      |
|                 | Leaf                                   |         |         | Stem   |         |          | Root   |           |          |
|                 | (mg kg <sup>-1</sup> )                 |         |         |        |         |          |        |           |          |
| Control         | 33.2 b <sup>†</sup>                    | 521.8 a | 940.9 a | 10.9 a | 178.6 a | 355.7 b  | 11.1 a | 1476.9 b  | 3921.0 a |
| S4              | 32.5 b                                 | 555.4 a | 940.1 a | 8.9 b  | 179.4 a | 373.4 ab | 12.4 a | 1724.5 a  | 4429.8 a |
| S6              | 36.8 a                                 | 559.6 a | 976.9 a | 9.6 ab | 169.0 a | 381.7 a  | 13.1 a | 1581.3 ab | 4089.8 a |

<sup>†</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at *P*=0.05.

적된 농도도 증가하였다. 그러나, 동일한 농도의 카드뮴을 처리한 시험구 별로 형질전환 담배와 비형질전환 담배의 잎과 줄기에 축적된 카드뮴의 농도를 비교해 볼 때 통계적인 유의차는 나타나지 않았다. 다만, 가장 높은 농도의 카드뮴을 처리한 시험구에서 형질전환 담배의 줄기에 비형질전환 담배의 줄기보다 높은 카드뮴 축적 양상을 보였다. 반면에 뿌리 중 카드뮴 농도는 형질전환 담배가 비형질전환 담배에 비해서 높았으며, 그 경향은 카드뮴 처리 농도가 증가할수록 뚜렷이 나타났다. 수경재배를 통해 *MuS1* 형질전환 담배의 카드뮴 저항성을 실험한 Kim et al. (2011b)에 의하면 *MuS1* 형질전환 담배는 대조구 담배에 비해 뿌리에 카드뮴을 더 많이 축적하고 지상부로의 이동을 줄여 카드뮴 대한 저항성을 나타낸다고 하였는데, 토양재배를 기반으로 한 본 실험에서도 형질전환 담배가 뿌리에 카드뮴을 높게 축적하는 것이 확인되었다. 이는 형질전환 담배가 카드뮴에 대한 독성 저항성이 뚜렷이 확보된다면, 식물학적복원 기술 중 중금속의 근권부고정 기술에 활용될 수 있음을 시사한다.

## 결론

본 연구는 수경재배 연구를 통해 보고된 *MuS1* 형질전환 담배의 카드뮴 독성 저항성에 대하여 실증적인 검증을 하고자 오염토양에 *MuS1* 형질전환 담배를 재배하면서 생리적 반응 및 카드뮴 축적 양상을 알아보고자 실시하였다. *MuS1* 형질전환 담배는 토양 중 고농도의 카드뮴 (180 mg kg<sup>-1</sup>)에 노출되었을 때 비형질전환 담배에 비해서 순광합성률에 대한 피해가 적었던 반면에, 수분이용효율이 떨어지고 기공전도도가 높게 유지되는 등 비형질전환 담배와는 다른 반응을 보였다. 그러나 본 토양재배 실험에서는 수경재배에서 보여준 카드뮴 독성 저항성에 대한 생리적 반응들이 뚜렷이 나타나지는 않았다. 이는 본 연구에서 설정한 카드뮴 농도 값이 너무 높았던 원인이 작용했을 것으로 판단된다. 카드뮴에 대한 생리적 저항 반응은 뚜렷이 나타나지는 않았지만, 수경재배를 이용한 연구결과와 같이 *MuS1* 형질전환 담배

가 근권부에 카드뮴을 고착시키는 능력이 본 토양재배 실험에서도 나타났다. 이는 *MuS1* 형질전환 담배가 식물정화공법 중 중금속 안정화 기술에 활용될 수 있음을 나타낸다. 그러나 실용적인 활용에 앞서, 장기간 재배실험을 통한 생리적 반응에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 판단된다.

## 인용문헌

Al-Amoudi, A., J. Dubochet, and D. Studer. 2002. Amorphous solid water produced by cryosectioning of crystalline ice at 113K. *J. Micros.* 207: 146-153.

Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Betavularis*. *Plant physiol.* 24(1): 1-15.

Baker, A.J.M., S.P. Mc Grath, D.R. Reeves, and J.A.C. Smith. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, Bañuelos G. (eds). *Phytoremediation of contaminated soils and water*. CRC Press. Boca Raton. FL. USA. pp. 171-188.

Caemmerer, S. and G.D. Farquhar. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta.* 153: 376-387.

Cresser, M.S. and J.W. Parsons. 1979. Sulfuric-perchloric acid digestion of plant material for the determination of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and magnesium. *Anal. Chem. Acta.* 109: 431-436.

Gadallah, M.A.A. 1995. Effects of cadmium and kinetin on chlorophyll content, saccharides and dry matter accumulation in sunflower plants. *Biologia. Plantar.* 37(2): 233-240.

Hinckley, T.M. and J.H. Braatne. 1994. Stomata. In: Wilkinson, R. E. (eds) *Plant-Environment Interactions*. Dekker. New York. pp. 323-355.

Kawashima, C.G., M. Noji, M. Nakamura, Y. Ogra, K.T. Suzuki, and K. Saito. 2004. Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants overexpressing cysteine synthase. *Biotechnol. Lett.* 26:153-157

Kim, J.G., S.K. Lim, S.H. Lee, Y.M. Yoon, and C.H. Lee.

1999. Evaluation of heavy metal pollution and plant survey around inactive and abandoned mining areas for phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Kor. J. Environ. Agric.* 18: 28-34.
- Kim, K.H., Y.N. Kim, G.H. Lim, M.N. Lee, and Y.H. Jung. 2011(a). Expression of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in *Mus1* transgenic tobacco under cadmium stress. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* 44(1): 53-57.
- Kim, Y.N., J.S. Kim, S.G. Seo, Y.W. Lee, S.W. Baek, I.S. Kim, H.S. Yoon, K.R. Kim, S.H. Kim, and K.H. Kim. 2011(b). Cadmium resistance in tobacco plants expressing the *Mus* gene. *Plant Biotechnol. Rep.* 5(4): 323-329
- Kozłowski, T.T. and S.G. Pallardy. 1997. *Physiology of Woody Plants*. Academic Press. New York. pp. 411.
- Krupa, Z. 1987. Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex II in radish cotyledons. *physiol. plant.* 73: 518-524.
- Lee, J.H., H.J. Bae, J.Y. Jeong, J.Y. Lee, Y.Y. Yang, I.H. Hwang, E. Martinoia, and Y.S. Lee. 2003. Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance to and decreases uptake of heavy metals. *Plant Physiol.* 133:589-596
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. pp. 350-382. National Academy of Agricultural Science. 2006. *Fertilizer Application Recommendation for Crops*. p. 240. Rural Development Administration, Suwon, Korea.
- Ok Y.-S., J.-G. Kim, J.E. Yang, H.-J. Kim, K.-Y. Yoo, C.-J. Park, and D.-Y. Chung. 2004. Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soils Using Transgenic Plants. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* 37(6): 396-406.
- Pan, A, M. Yang, F. Tie, L. Li, Z. Chen, and B. Ru. 1994. Expression of Mouse Metallothionein-I Gene Confers Cadmium Resistance in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Mol. Biol.* 24: 341-351.
- Prasad, M.N.V. 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Experiment. Botany.* 35(4): 525-545.
- Roh, K.S. and H.S. Chin. 2005. Cadmium toxicity and calcium effect on growth and photosynthesis of tobacco. *J. Life Sci.* 15(3):453-460.
- Seo, S.G. J.S. Kim, Y.S. Yang, B.K. Jun, S.W. Kang, G.P. Lee, W. Kim, J.B. Kim, H.U. Lee, and S.H. Kim. 2010. Cloning and characterization of the new multiple stress responsible gene I (*Mus1*) from sweet potato. *Genes. Genomics.* 32: 544-552.
- Stobart, A.K., W.T. Griffiths, I. Ameen-Bukhari, and R.P. Sherwood. 1985. The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 63: 293-298.
- Westerman, R.L. 1990. *Soil testing and plant analysis*, 3<sup>rd</sup> ed. SSSA book series. 3: 389-427.
- Zhu, Y.L., E.A. H. Pilon-Smits, L. Jouanin, and N. Terry. 1999. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119:73-79.