최 종
연구보고서

생물공학기술을 이용한 환경오염 정화용 포플러의 선발 및 육종

Selection and Breeding of Poplar for Decontamination of Environmental Pollution using Bio-technology

연구기관

서울대학교 농업생명과학대학

농 림 부

〔별지 제7호 서식〕

최 종 보 고 서

1996년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 생물공학기술을 이용한 환경오염 정화용 포플러의 선발 및 육종에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

1999. 11. 30.

주관연구기관 : 서울대학교 농업생명과학대학

총괄연구책임자 : 현 정 오 (인)

주관연구기관장 : 서울대학교 총장 직 인

농 림 부 장 관 귀 하

편집순서 2

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “첨단기술에 관한 연구” 과제 (세부과제 “생물공학기술을 이용한 환경오염 정화용 포플러의 선발 및 육종에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 11. 30.

주관연구기관명 : 서울대학교 농업생명과학대학
총괄연구책임자 : 현 정 오
협동연구기관명 : 산림청 육종부
협동연구책임자 : 손 성 호
협동연구기관명 : 전북대 유전공학연구소
협동연구책임자 : 양 문 식

편집순서 3

요 약 문

Ⅰ. 제 목

생물공학기술을 이용한 환경오염 정화용 포플러의 선발 및 육종에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

오늘날 우리가 살고 있는 사회는 급격한 산업 활동의 증가, 인구의 도시 집중, 교통량의 증가, 독성 농약의 과다 사용 등으로 인한 심각한 환경오염 문제에 직면하고 있다. 더욱이 근년에는 중국에서 불어오는 황사와 함께 납(Pb), 카드뮴(Cd)등의 중금속 공해 물질이 전파되어져 우리 나라 전역이 오염되고 있어 그 심각성은 더욱 커지고 있다. 이들 중금속 물질들은 대부분 비분해성이기 때문에 장기간 토양 중에 잔류, 축적되어 각종 식물의 성장과 발달에 저해 요인으로 작용할 뿐 아니라, 먹이사슬을 통해 인체 내로 섭취될 경우 간 등의 주요기관에 축적되어 각종 질병을 유발시킬 위험성을 갖고 있다. 그러나 지금까지의 전통적인 오염 제거 방식(Landfilling, Fixation, Leaching)은 그다지 효과를 거두지 못하고 있는 실정이다. 중금속을 흡수한 식물은 영구적으로 오염된 토양으로 부터 중금속을 흡수하는데 기여할 수 있으며, 장기적인 토양의 개량 효과를 유도할 수 있으므로 식물에 대한 중금속의 저항성, 흡수력 등에 대한 연구가 오염지나 척박지의 복원 및 오염도 감소를 위한 토양 환경 개선의 측면에서 빠른 시일 내에 진행되어져야 한다.

지금까지 오염원에 대한 식물의 정화능은 담수수계에 분포하는 일부 아열대성 수

생식물을 대상으로 이루어졌으므로, 생태계 보존과 중금속 오염의 제거가 시급히 요청되는 우리 나라 실정에서는 우리 나라에서 자생하는 식물의 중금속 정화능력의 연구 및 이의 활용 대책이 절실히 요망된다. 현재 환경 정화용 식물 개발에 관한 국내 보고는 아직 없으며, 환경오염의 심각성에 비추어 앞으로 이에 관한 집중적인 연구가 요망된다고 하겠다.

유전공학 및 식물 조직배양 기법을 이용하여 식물체를 형질전환 시킬 수 있는 기술은 최근에 급격히 발달하기 시작하였으며 궁극적으로 농업 생물 공학, 농업 신 소재 개발, 자연자원 보전을 위한 연구, 그리고 환경보전을 위한 연구 등의 연구 영역으로 확대, 강조되어질 전망이다. 이미 선진국에서는 이와 같은 기술을 이용하여 충해에 저항성이 있는 식물의 개발, 내병성 식물의 개발, 제초제 저항성 식물의 개발, 가뭄이나 고농도의 염에서도 견딜 수 있는 식물의 개발, 영양적 가치가 증진된 식물 개발 등에 많은 관심을 가지고 집중 투자 하고 있다. 국내에서도 몇몇 실험실에서 상기와 같은 목적으로 연구가 진행 중인 것으로 알려져 있으나 아직 초기 단계의 연구라 생각된다. 특히 환경정화용 식물 개발에 관한 국내보고는 아직 없으며 환경오염의 심각성에 비추어 앞으로 이에 관한 집중적인 연구가 요망된다고 하겠다.

본 연구는 환경 공해 물질인 중금속을 중심으로 이에 대한 내성이 가장 큰 식물을 선발함과 동시에 선발 식물에서의 중금속 흡수 기작과 환경오염 물질에 대한 식물의 반응 기작을 밝히고, 형질 개량된 식물을 응용 오염된 현지에 재배하여 식물의 환경 정화 능력을 검정하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 환경오염 정화 수목의 선발과 균근균을 이용한 오염물질의 정화능력 향상

본 연구는 목본식물 중 포플러 속에서의 중금속 내성 및 흡수능이 우수한 수종 선발하고, 목본식물과 공생을 하고있는 균근균을 접종하여 중금속에 대한 흡수능력을 향상시키고자 하였다. 또한 균근균이 접종된 묘목을 오염지에 이식하여 현지의

적응력을 검토하며 식물체내 중금속 축적 기작을 밝히고자 다음과 같이 추진하였다.

가. 오염지 현황 및 특성 파악

본 연구의 대상지 선정을 하고 특성을 파악하기 위하여 오염지의 토양 특성을 측정하였다. 조사대상지는 폐광지를 중심으로 조사하였으며, 오염원을 중심으로 거리에 따른 오염도 추이를 측정하기 위하여 깊이별(1 15cm, 15 30cm)로 토양 시료를 채취하였다. 채취된 토양 시료는 pH , 양이온치환능력, 각종 중금속 함량 등을 측정하여 내성 수종을 선발하기 위한 설계 기준으로 이용하였다.

나, 균근균의 중금속에 대한 내성 평가 및 내성 균종의 선발

공시 균주는 *Pisolithus tinctorius*, *Laccaria laccata*, *Suillus bovinus* 및 *Suillus luteus*의 4종을 이용하였으며, 중금속(Zn, Cu, Pb)이 처리된 배지 위에서 52일간 배양하였다. 각 균근균이 배양되는 동안, 일정한 간격으로 생장속도를 측정하였으며, 생장이 종료된 후, 균사를 분리하여 균사내 중금속 농도를 측정하였다. 측정결과는 각 균근균의 중금속에 대한 내성 평가와 내성 균근균을 선발하는데 이용하였다.

다. 포플러 속의 내성 수종 선발 및 내성 특성 분석

생장속도가 빠르고, 근계 발달이 왕성한 포플러 속 중 현사시나무(*Populus alba* ×*gandulosa*), 수원포플러(*Populus koreana* × *nigra var. italica.*), 양황철나무(*Populus nigra* × *maximowiczii*), 이태리포플러(*Populus euramericana*)를 각각 무처리구, 중금속(Cd, Pb)처리구로 구분하여 식재하였다.

중금속 처리는 오염지의 중금속 함량을 고려하여 시용량을 달리하여 처리한 후 식재 하여, 각 수종의 생리적인 특성을 조사하였으며, 수확 후 생체량 및 체내 중금속 농도를 측정하여, 수종별 내성 특성을 분석하였다.

라. 오염지에서의 생장특성 및 적응력

선발된 수종은 인위적으로 처리된 오염지에 식재하였으며, 생장이 완전히 끝난 후 줄기를 수확하였다. 수확된 줄기는 건조 후에 각 수종별로 생체량이 측정되었으며, 측정 결과를 이용하여 중금속에 대한 반응과 균근균에 대한 생장반응을 비교하였다.

2. 중금속 결합 단백질 유전자 도입에 의한 토양 중금속 제거 수목의 육종

가. Metallothionein 및 Ferritin유전자의 클로닝

본 연구에서는 유전자 염기서열이 밝혀진 rat (*Rattus norvegicus*)의 class - I metallothionein 유전자의 염기서열을 바탕으로 computer program을 이용하여 PCR의 primer로 사용될 수 있는 5‘ primer (5' - TCg TCA CTT CAg gCA CAg CA - 3'), 3' primer (5'-TCG TCA CTT CAG GCA CAG CA-3')를 합성하여 PCR을 실시하여 유전자를 클로닝하였다.

Ferritin유전자의 클로닝은 이미 알려진 ferritin유전자 H - chain과 L - chain의 염기서열로부터 5' primer(H -chani 5' - Agg CCC CCg CCg CCg CTC CAg CCA - 3' ; L - chain 5' - gAT CCg ggg ACT CTC TTC - 3')과 3‘primer (H - chain 5' - ggT ACC AAA TTT CTT TAT TTg - 3'; L- chain 5' - ggg CCC TTC AgA AgT CgC Tgg - 3')의 primer를 합성하고, 인간의 심장과 간 세포배양액에 Fe를 처리하여 ferritin유전자 발현을 유도하여 분리한 mRNA로부터 reverse transcriptase를 사용하여 first strand cDNA를 합성 한 후 RT-PCR을 행하여 ferritin유전자를 클로닝하였다.

나. Metallothionein 및 Ferritin유전자의 특성화

유전자의 특성화를 위해 cloning한 유전자의 염기서열을 dideoxynucleotide chain termination 방법으로 결정하였다. 염기서열 결정의 효율을 높이기 위해 획득한

clone을 unidirectional deletion 방법으로 처리하여 적절한 크기의 단축 clone들을 획득, sequencing에 사용하였다.

다. Metallothionein 및 Ferritin유전자의 식물체내 도입을 위한 재조합 유전자의 제조

특성화된 Metallothionein 및 Ferritin유전자를 식물로의 도입 및 발현시키기 위해 식물발현용 유전자 운반체와 재조합하였다. 식물 유전자 운반체로는 Agrobacterium의 Ti-plasmid에서 유도된 운반체를 사용하였다. 도입 유전자의 발현을 결정하는 5'-조절인자는 식물 virus인 cauliflower mosaic virus(CaMV)에서 유도된 항시성 promoter인 35S promoter와 이것에 enhancer부위를 부착한 duplicate 35S promoter를 사용하였다. 또 이 재조합 운반체는 형질전환 세포의 선발을 위해 bacteria의 neomycin phosphotransferase II (NPT II)를 함유하고 있어 항생물질에 의해 형질전환 세포를 선발하였다.

라. 포플러의 형질전환 및 재분화

수원포플러를 공시재료로 하여 성숙목의 가지를 채취하여 온실에서 눈을 띄워 액아를 유도한 후 액아 절편체를 잘라서 MS배지에 치상하였고, 매 4주마다 계대배양하였다. 기내에서 생장중인 엽병과 절간조직을 형질전환 재료로 이용하였다. 재조합 유전자를 포함하는 *A. tumefaciens* 균주를 접종한 후 캘러스 형성이 용이하도록 메스로 잘게 상처를 준다. 준비된 엽병 및 절간조직 절편체를 LB배지에서 overnight 배양하여 키운 *A. tumefaciens* LBA4404와 함께 co-culture한 후 멸균된 여과지에 놓아 과잉의 박테리아 액을 닦아내고, MS 배지에 암소 배양하였다. 공조 배양 후, 절편체를 캘러스 유도배지에서 2주간 암배양을 하였다. 그후 재분화배지에 2주마다 계대배양하였다. 캘러스로부터 재 분화된 줄기는 발근 배지에서 뿌리를 형성시킨 후, 온실에서 폿트묘로 육성하였다.

마. 재분화 포플러의 분석

Antibiotics에 내성을 가지는 재분화 포플러에서 얻은 DNA를 여러 제한효소로 자른 절편과 도입유전자 특이적 부분을 방사성 동위원소로 표지한 probe간의 DNA-DNA hybridization을 이용한 Southern-blot analysis를 실시하여 도입된 유전자의 안정성을 결정하고 나아가 식물 염색체에 얼마나 많은 copy로 존재하는가를 결정하였다. 또한 도입유전자의 발현량을 확인하기 위하여 식물 조직에서 mRNA를 분리한 후 재조합 유전자가 전사되는가를 Northern-blot analysis를 통해 확인하였다.

바. *in vitro*에서의 형질전환 식물체내 중금속 축적의 분석

선발되어진 형질전환체의 중금속 정화능력을 조사하기 위하여 농도별 각종의 중금속을 포함하는 배지에서 생육을 시킨 후 세포 내에 축적되어진 중금속의 양을 측정하고 정화능력이 뛰어난 개체를 선발하였다. 중금속의 분석은 원자흡광도계를 이용하여 측정하였다.

사. 오염지역에의 적용시험 및 중금속 축적의 분석

선발되어진 중금속 정화능력이 우수한 형질전환체를 순화시킨 후에 개체의 증식을 하고 이를 실제 오염지역에 재배하여 각 개체의 중금속 정화능력을 조사한다. 중금속의 분석은 원자흡광도계를 이용하여 측정하였다.

3. NO2 동화경로 관여 유전자 도입에 의한 대기오염 정화 포플러의 육종

본 연구에서는 NO2 동화경로의 관여 효소 중 NiR 유전자의 발현수준을 인위적으로 조절할 수 있도록 재조합 되어진 유전자를 포플러에 도입, 발현시켜 대기오염물질을 정화시킬 수 있는 식물을 육성하고자 한다. 위와 같은 목적을 달성하기 위하여 사용하는 방법은 아래와 같다.

가. NiR 유전자의 cloning

본 연구에서는 암상태에서 키운 *Spinacia oleracea*의 잎으로부터 RNA를 분리한 후 이미 알려진 cDNA의 염기배열을 기본으로 하여 computer program을 이용 transcription initiation site를 포함하는 5' primer(5'-GGA ATT CCA TCA GAT TAA CAT AAT TTC ACA AT-3')와 polyadenylation signal을 포함하는 3' primer(5'-GTA ATA TAA TTC TAA CAA TTA-3')를 디자인하고 reverse transcriptase를 이용한 RT-PCR을 실시한다. PCR반응에 의해 특이적으로 증폭된 DNA를 agarose gel에서 분리 획득하여 kinase와 klenow enzyme을 처리한 후 plasmid vector(pUC18)에 blunt-end ligation을 하여 cloning하였다.

나. 유전자의 특성화

유전자의 특성화를 위해 cloning한 유전자의 염기서열을 dideoxynucleotide chain termination 방법으로 결정하였다. 염기서열 결정의 효율을 높이기 위해 획득한 clone을 unidirectional deletion 방법으로 처리하여 적절한 크기의 단축 clone들을 획득, sequencing에 사용하였다. 확인된 NiR cDNA를 식물에서 발현할 수 있도록 재조합을 하였다.

다. NiR 유전자의 식물체내의 도입을 위한 재조합 유전자 제조

특성화된 *Spinacia oleracea*의 NiR 유전자를 식물로의 도입 및 발현시키기 위해 식물발현용 유전자 운반체와 재조합하였다. 식물 유전자 운반체로는 Agrobacterium의 Ti-plasmid에서 유도된 운반체를 사용하였다. 도입 유전자의 발현을 결정하는 5'-조절인자는 식물 virus인 cauliflower mosaic virus(CaMV)에서 유도된 항시성 promoter인 35S promoter와 이것에 enhancer부위를 부착한 duplicate 35S promoter를 사용하였다. 또 이 재조합 운반체는 형질전환 세포의 선발을 위해 bacteria의 neomycin phosphotransferase II (NPT II)를 함유하고 있어 항생물질에 의해 형질전환 세포를 선발하였다.

라. 포플러의 형질전환 및 재분화

수원포플러를 공시재료로 하여 성숙목의 가지를 채취하여 온실에서 눈을 띄워 액아를 유도한 후 액아절편체를 잘라서 MS배지에 치상하고, 매 4주마다 계대배양하였다. 기내에서 생장중인 엽병과 절간조직을 형질전환 재료로 이용하였다. 재조합 유전자를 포함하는 *A. tumefaciens* 균주를 접종한 후 캘러스 형성이 용이하도록 메스로 잘게 상처를 주었다. 준비된 엽병 및 절간조직 절편체를 LB배지에서 overnight 배양하여 키운 *A. tumefaciens* LBA4404과 함께 co-culture한 후 멸균된 여과지에 놓아 과잉의 박테리아 액을 닦아내고, MS 배지에 암소 배양하였다. 공조배양 후, 절편체를 캘러스 유도배지에서 2주간 암배양 하였다. 그 후 재분화배지에 2주마다 계대배양하였다. 캘러스로 부터 재 분화된 줄기는 발근 배지에서 뿌리를 형성시킨 후, 온실에서 폿트묘로 육성하였다.

마. 재분화 포플러의 분석

Antibiotics에 내성을 가지는 재분화 포플러에서 얻은 DNA를 여러 제한효소로 자른 절편과 도입유전자의 특이적 부분을 방사성 동위원소로 표지한 probe간의 DNA-DNA hybridization을 이용한 Southern-blot analysis를 실시하여 도입된 유전자의 안정성을 결정하고 나아가 식물 염색체에 얼마나 많은 copy로 존재하는가를 결정하였다. 또한 도입유전자의 발현량을 확인하기 위하여 식물 조직에서 mRNA를 분리한 후 재조합 유전자가 전사되는가를 Northern-blot analysis를 통해 확인하였다.

바. 형질전환 식물체의 NO2에 대한 저항성 조사

선발되어진 형질전환체의 NO2의 정화능력을 조사하기 위하여 NO2를 농도별로 처리한 생장상에서 생육을 시킨 후, kjeldahl 분해장치를 이용하여 세포내의 질소량을 측정하고 정화능력이 뛰어난 개체를 선발한다. 선발되어진 NO2 정화능력이 우수한 형질전환체를 순화시킨 후에 개체의 증식을 하고 이를 실제 오염지역에 재배하여 각 개체의 대기오염 정화능력을 조사하였다

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 환경오염 정화 수목의 선발과 균근균을 이용한 오염물질의 정화능력 향상

본 연구에서 조사된 대부분의 폐광산의 주변 토양은 중금속에 의해 오염되어 있었으며, 일부 폐광산의 Zn, Pb의 농도는 독성을 나타낼 수 있는 수준이었다. 특히 광구 중심으로부터 멀어질수록 중금속 농도가 감소하는데, 이것은 오염원 가까이에서 피해가 증가할 수 있음을 나타낸다. 오염지에서 채취된 수목에서의 중금속의 축적 농도는 현사시나무가 가장 높았으며, 부위별 축적 농도는 수종에 따라 큰 차이를 보여 주었다. 또한 토양과 수목간의 중금속 농도의 관계는 매우 높은 정의 상관을 보여주었다. 균근균의 중금속 내성에 대한 연구 결과, 균근균은 각 중금속에 따라 또는, 중금속의 농도에 따라 생장특성, 내성특성 및 축적 특성이 다르게 나타났다. 또한 대부분의 균근균은 중금속에 대해 생장 저해를 받는 것으로 나타났으며, 일부는 생장이 지연되며, 일부 균근균은 중금속에 대한 적응 및 내성 기작을 통하여 생장이 회복되는 현상이 나타났다. 균근균의 접종을 통한 수목에서의 중금속 흡수 능력 및 생리적인 특성을 연구한 결과 대부분의 수목은 균근균의 접종에 따라 중금속의 흡수 능력이 증가되는 것으로 나타났으며, 중금속의 처리 농도가 증가함에 따라 흡수량이 증가하였다. 그러나 중금속 흡수 능력은 수종 및 중금속의 종류에 따라 차이가 있었으며, 중금속의 농도나 균 접종에 따른 생장량의 변화는 없었다. 또한 중금속의 처리 농도에 따라 각 수종별로 생리적인 활성이 저해되거나 촉진되었다. 이것은 중금속 처리와 균근균과의 상호 작용에 의해 나타나는 현상으로 각 수종별 중금속에 대한 내성 및 저항 능력의 차이가 있음을 보여 주었다. 또한 중금속이 처리된 묘목의 이식 후 생장량은 중금속의 농도에 따른 차이는 없었지만 균근균의 접종효과는 크게 나타나 중금속으로 오염된 지역에서 균근균이 수목의 생장에 도움이 될 수 있음을 보여 주었다.

결론적으로 대부분의 수목은 중금속에 대한 흡수 능력이 우수하며, 중금속에 대한

내성을 가지고 있는 것으로 판단된다. 또한 수목에 균근균을 접종하여 중금속의 흡수능력을 향상시킬 수 있으며, 향후 오염된 토양의 정화와 식생 복원에 적용 가능하다고 판단되다. 그러나 수목을 이용한 정화 효율을 최대로 높이기 위해서는 자생 균의 선발과 서식 환경 특성이 정확하게 규명되어야 하며, 각 중금속에 대한 균별 생리적인 특성에 대한 추가 연구와 오염지 자생 수목에서의 중금속의 흡수 특성 및 내성 기작에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 한다.

2. 중금속 결합 단백질 유전자 도입에 의한 토양 중금속 제거 수목의 육종

토양중금속 오염을 제거하기 위한 생물학적 접근방법으로 외래 유전자 도입을 이용한 중금속 흡수 포플러를 개발하였다. 올챙이의 ferritin 유전자와 쥐의 metallothionein 유전자를 조작하여 식물 발현용 vector를 제조한 뒤 이를 이용하여 현사시 (Populus alba x P. glandulosa)에 Agrobacterium tumefaciens LBA4404를 이용하여 도입시켰다. 유전자가 삽입된 세포들을 줄기유도배지 및 발근배지를 이용하여 완전한 식물체로 성숙시킨 후 이 식물체들을 이용하여 시험관 및 온실에서 유전자 발현 및 중금속 내성 시험을 실시하였다. 유전자발현 검정은 nptII 검정, Southern hybridization, RT-PCR 및 항생제 저항성 시험으로 수행하여 확인하였고 중금속 내성 검정은 카드뮴 배지에서의 수경재배, 캘러스 유도, 줄기 유도 등을 조사하였다. 세포의 스트레스에 대한 생화학적 반응은 폴리아민, Evans blue, MTT 등을 이용하여 수행하였다. 시험관내 식물을 이용한 카드뮴 내성 실험결과 형질전환체가 대조구 식물보다 더 생장이 왕성하였고 이것은 0.5mM 농도에서 뚜렷하게 나타났다. 카드뮴 0.1mM이 첨가된 배지에서 배양된 식물체의 카드뮴 함량을 분석한 결과 형질전환체가 대조구 식물보다 2배 이상의 카드뮴을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 온실에서 수경재배를 통한 중금속 내성 실험도 같은 결과를 보여 역시 0.1mM 에서 줄기 생장 및 뿌리 발생에 가장 좋은 결과가 나타났다. 중금속 처리에 따른 식물의 반응을 비교하기 위하여 카드뮴 처리 전후 하루 간격으로 세포내 폴리아민 함량을

분석한 결과 형질전환체와 대조식물이 putrescine과 spermidine의 변화가 서로 상이하게 나타남을 확인하였다. Evans blue 및 MTT의 반응결과도 형질전환체와 대조식물이 서로 다른 패턴을 보여 삽입된 유전자가 제한적이나마 작용하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 적절한 유전자의 확보, 유전자 발현의 안정성 등의 몇 가지 문제를 해결한다면 유전공학을 이용한 환경오염원 제거는 가능할 것으로 기대된다.

3. NO2 동화경로 관여 유전자 도입에 의한 대기오염 정화 포플러의 육종

유전공학적 기법을 이용하여 대기오염 정화 포플러의 육종을 위하여 시금치로부터 3.0 Kb에 해당하는 Nitrite reductase (NiR)의 유전자를 PCR기술을 이용하여 분리하였다. 분리된 시금치의 NiR 유전자의 염기를 확인 한 후에 duplicated CaMV 35S promoter를 갖고있는 식물발현용 vector인 pMY27에 도입하여 pMYN6을 구축하였다. pMYN6을 *A. tumefaciens*에 도입 한 후에 *A. tumefaciens*을 이용하여 담배와 포플라에 형질전환 시켰다. 항생제에 저항성을 보이는 재분화 식물체를 획득하고 PCR 기술을 이용하여 유전자의 도입여부를 확인하였다. 도입된 시금치의 NiR 유전자가 정상적으로 발현하는지의 여부는 Northern blot analysis를 통하여 확인하였다. Wild type과 형질전환체의 NiR 효소활성은 크게 차이를 나타내어 형질전환체가 3-4배정도의 높은 NiR 효소활성을 나타내었다. 본 연구를 통하여 얻어진 환경오염 정화 기술은 환경오염물질 정화를 위한 기초지식을 제공하고, 최종적으로 오염된 환경을 원상태로 되살릴 수 있을 뿐만 아니라, 환경오염물질의 제거 및 정화로 인한 커다란 경제적 손실을 막을 수 있을 것이다. 또한 쾌적한 환경을 제공함으로써 생산성을 향상시키고 국민 보건향상에 이바지하며, 현재 어느 국가도 실용화 단계까지의 기술은 확보하고 있지 못하므로 본 연구의 결과는 국제적으로도 환경정화사업을 선도적으로 수행해 갈 수 있기 때문에 국제적으로 기술적 우위를 가진 독창적 기술을 확보할 수 있다.

편집순서 4

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title of the Research

Selection and breeding of poplar for decontamination of environmental pollution using bio-technology

II. Objectives and Significance of the Research

Part I. Development of plants with high decontaminating ability using mycorrhizal fungi.

This study was conducted i) to evaluate heavy metal concentrations in the soil and plant of spoil mines, ii) to test the *in vitro* tolerance of ectomycorrhizal fungi against heavy metals commonly found in mine area. iii) to develope plants with high metal uptake ability using mycorrhizal fungi.

Part II. Development of transgenic poplars carrying heavy metal binding protein genes for cleaning of polluted soil

The objectives of this research were i) to develop plant expression vectors carrying heavy metal binding protein genes for phytoremediation, ii) to regenerate

transgenic poplars that carry the genes, and iii) to develop tolerance test systems fo the plants

The significance of the present work include **i**)the development of transgenic poplars that have enhanced tolerance to cadmium, and **ii**)the application of a number of biochemical assay systems to the study of cellular response of transgenic plants to heavy metal stress.

The system we employed should be very useful to those who study stress using other plant cell culture system.

Part III. Development of Air-Pollutant-Philic Plants by transformation of nitrite reductase

The objectives of this research was to develope "Air-Pollutant-Philic Plant" that can grow with atmospheric NO2 as a sole nitrogen source.

III. Contents and Scope of the Research

Part I. Development of plants with high decontaminating ability using mycorrhizal fungi.

Soils and leaves, stems, and roots of tree species were collected from closed mine sites. Metal concentration in tissue and soil was analyzed, the realtion to plant and soil was identified. Four mycorrhizal fungi(*Pisolithus tinctorius*, *Laccaria laccata*), *Suillus bovinus*, and *Suillus luteus*) were incubated on medium treated with heavy metals(Zn, Pb, and Cu) for 52 days. Their metal tolerance was tested through measuring the fungal growth and the metal concentration in

fungal mycelia. Four *Populus* species were inoculated with mycorrhiza(*Pisolithus tinctorius*), and were treated with Cd(0, 30ppm and 80ppm) and Pb(0, 50ppm and 300ppm) in soil. Physiological characters of poplars were measured for the growing season, and their heavy metal tolerance and metal uptake ability were analyzed at the end of the growing season,

Part II. Development of transgenic poplars carrying heavy metal binding protein genes for cleaning of polluted soil

This work basically aims at the development of transgenic poplars that could withstand heavy metal stress. Since no such systems were available at the beginning, this project dealt with all the steps to develop a phytoremediation system ranging from cloning the genes to tolerance test of transgenic poplars.
These are i) cloning of the MT and ferritin gene by RT-PCR, ii) construction of plant expression vectors using the genes, iii) transformation of poplar using the vectors, iv) regeneration and propagation of transgenic poplars for tolerance test, v) confirmation of both transformation and gene expression by PCR and RT-PCR, and vi) tolerance test using in vitro assays as well as by various biochemical methods.

Part III. Development of Air-Pollutant-Philic Plants by transformation of nitrite reductase

Nitrite reductase (NiR) is a key enzyme. NiR gene (3.0 Kb) from *Spinacia oleracea* was amplified by PCR and full length sequence was identified. The constructed vector which contains NiR gene of *Spinacia oleracea* was fused to the duplicated CaMV 35S promoter. The plasmid was introduced into tobacco and poplar plants using *A. tumefaciens* harboring NiR gene.

IV. Results and the Research and Suggestions for the Application

Part I. Development of plants with high decontaminating ability using mycorrhizal fungi.

Soils of the closed mine sites were not seriously contaminated by heavy metals, but Zn and Pb concentrations were at toxic level. The heavy metal concentration in soils decreased with increasing distance from spoil mining sites. *Populus alba×glandulosa* showed high heavy metal concentrations in the tissue. *Populus alba×glandulosa*, based on the high metal uptake ability, could be used for decontaminating heavy metals from contaminated soils, and *Pinus rigida* could be used as indicator which reflects the level of contamination in soils. Mycorrhizal fungi tested showed high tolerance against three heavy metals(Cu, Zn, and Pb), and also accumulated high amount of metals in mycelia. Poplars inoculated with mycorrhizal fungi showed increased heavy metal uptake ability and content in tissues with increasing the treatment concentration of metals. But metal uptake ability varied with tree species and kind of heavy metal. The physiological activity of poplars treated with heavy metal was inhibited or increased. Stem biomass of poplars transplanted to polluted soil with heavy metals was increased with mycorrhizal innoculation, In conclusion, most trees showed high uptake ability and tolerance for heavy metal, and thus mycorrhizal host trees may be used for revegetation and decontamination of soil polluted by heavy metals.

Further inoculation study is needed to verify the adaptability of fungi to polluted soil through interaction with ectomycorrhizal host trees.

Part II. Development of transgenic poplars carrying heavy metal binding protein genes for cleaning of polluted soil

As an approach to the phytoremediation of contaminated soil, transgenic poplars carrying heavy metal binding genes from other sources were developed. Both ferritin gene from tadpole and metallothionein gene from rat were PCR cloned and subcloned into plant expression vector pMY series. The resulting recombinant plasmids were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for plant transformation. A hybrid poplar clone (*P. alba* x *P. glandulosa*) was transformed by the vectors and subsequently a number of transgenic plants were obtained. The transformation and expression of the genes were confirmed by genomic PCR, RT-PCR ELISA and resistance test to kanamycin.

The tolerance tests to cadmium at various concentrations were done both *in vitro* and in the greenhouse. As in vitro test, the stems of transgenic plants were cultured on the shoot inducing media containing various levels of cadmium. The ferritin gene transformed plants did better than control plants in shoot growth from axillary buds in the presence of cadmium. The total cellular cadmium contents were also compared after growing both transgenic and control plants on the media containing 0.1 mM cadmium. Transgenic plants contained about twice as much cadmium as did control plants suggesting that the transgenic plants have increased capacity of holding cadmium. In the greenhouse experiment, stems from the transgenic plants growing in the nursery were cultured in hydroponic solution containing several levels of cadmium. The transgenic poplars grew better than control at the concentration of 100 uM cadmium in the culture. When these plants were assayed for their change in cellular polyamine levels, transgenic plants behaved differently from controls. Whereas transgenic plants did not respond to the addition of cadmium in the culture, control plants showed a sharp increase in putrescine level. However, in the case of cellular spermidine,

while control plants did not show any change, transgenic plants showed a peak within 24 hours of cadmium addition. Also tested were Evans blue assay for the integrity of protoplasma membrane by heavy metals in cell culture and MTT for mitochondrial enzyme activity. Both indicated that the transgenic plants showed different pattern from control plants when heavy metal stress was imposed. Based on the above results, we propose here that it might be possible to apply genetic engineering techniques to clean the polluted environment by using woody plants.

Part III. Development of Air-Pollutant-Philic Plants by transformation of Nitrite reductase

We have been studying "Air-Pollutant-Philic Plant" that can grow with atmospheric NO2 as a sole nitrogen source. Nitrite reductase (NiR) is a key enzyme. NiR gene (3.0 Kb) from *Spinacia oleracea* was amplified by PCR and full length sequence was identified. The constructed vector which contains NiR gene of *Spinacia oleracea* was fused to the duplicated CaMV 35S promoter. The plasmid was introduced into tobacco and poplar plants using *A. tumefaciens* harboring NiR gene. PCR and Northern blot analyses confirmed the introduction and expression of spinach NiR gene in the leaves of transgenic tobacco and poplar. Transgenic plants that exhibited the NiR enzyme activity more than 3-4 times higher than wild type were obtained.

편집순서 5

CONTENTS
(영 문 목 차)

편집순서 6

목 차

제 1 장 서 론

오늘날 우리가 살고 있는 사회는 급격한 산업 활동의 증가, 인구의 도시 집중, 교통량의 증가, 독성 농약의 과다 사용 등으로 인한 심각한 환경오염 문제에 직면하고 있다. 더욱이 근년에는 중국에서 불어오는 황사와 함께 납(Pb), 카드뮴(Cd)등의 중금속 공해 물질이 전파되어져 우리 나라 전역이 오염되고 있어 그 심각성은 더욱 커지고 있다. 이들 중금속 물질들은 대부분 비분해성이기 때문에 장기간 토양 중에 잔류, 축적되어 각종 식물의 성장과 발달에 저해 요인으로 작용할 뿐 아니라, 먹이사슬을 통해 인체 내로 섭취될 경우 간 등의 주요기관에 축적되어 각종 질병을 유발시킬 위험성을 갖고 있다. 그러나 지금까지의 전통적인 오염 제거 방식(Landfilling, Fixation, Leaching)은 그다지 효과를 거두지 못하고 있는 실정이다. 중금속을 흡수한 식물은 영구적으로 오염된 토양으로 부터 중금속을 흡수하는데 기여할 수 있으며, 장기적인 토양의 개량 효과를 유도할 수 있으므로 식물에 대한 중금속의 저항성, 흡수력 등에 대한 연구가 오염지나 척박지의 복원 및 오염도 감소를 위한 토양 환경 개선의 측면에서 빠른 시일 내에 진행되어져야 한다.

지금까지 오염원에 대한 식물의 정화능은 담수수계에 분포하는 일부 아열대성 수생식물을 대상으로 이루어졌으므로, 생태계 보존과 중금속 오염의 제거가 시급히 요청되는 우리 나라 실정에서는 우리 나라에서 자생하는 식물의 중금속 정화능력의 연구 및 이의 활용 대책이 절실히 요망된다. 현재 환경 정화용 식물 개발에 관한 국내 보고는 아직 없으며, 환경오염의 심각성에 비추어 앞으로 이에 관한 집중적인 연구가 요망된다고 하겠다.

일반적으로 생물들은 환경 변화에 대하여 그 변화에 적응해 가는 쪽으로 신호 전달 체계가 발달되어 있다. 식물의 경우는 그 성장과 발달에 필요로 하는 일부의 중금속과 아직 그 생물학적 기능이 잘 알려져 있지 않은 Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se등도 식물 체내에 축적시킨다. 식물에서도 중금속 결합단백질인 ferritin이 정제되어 그 특성의 일부가 밝혀진 바 있으며, 이 ferritin은 Fe^{3+} 뿐만 아니라 Cu^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+},

Cd^{2+}, Bd^{2+}, Al^{3+} 등과도 *in vitro*와 *in vivo*에서 모두 결합할 수 있어 이 ferritin을 이용한 중금속 이온들의 정화가능성이 제기되었다. 그러나 식물의 경우 최근 완두, 옥수수, 애기장대 그리고 개화식물인 *Mimulus guttatus*의 경우 metallothionein유전자의 존재가 제시되고 있으나 현재 밀에서 보고된 Zinc-binding metallothionein인 Ec를 제외한 식물에서의 그 기능과 존재는 확인되어 있지 않다. 그러나 실제로 외래 MT 유전자를 재 조합하여 식물체에서 발현시킨 경우 식물체 잎의 전체 단백질 중 최고 0.1%의 높은 수준까지 발현시킨 경우가 보고되어 있다.

일반적으로 식물을 고농도의 NO_2에 접촉시키면 생리적 장해를 일으키며 특히 SO_2와 O_3과 같은 다른 대기오염물질과 동시에 접촉되어지면 저 농도의 NO_2에서도 현저한 장해를 발생한다. 식물의 NO_2^-는 통상 세포 내에 1㎛M정도의 낮은 농도로 유지되고 있으나 고농도의 NO_2는 NR에 의하여 NO_3^-로 부터 환원되어진 NO_2^-가 세포질에 축적되어 독성으로 작용하여 carbonic anhydrase활성을 저해하며, 이 효소의 활성 저하에 의하여 CO_2의 탄산고정계에 공급이 억제되어지고 광합성속도가 저하되어 생육에 장해를 가져오게 된다. 이에 대하여 식물은 축적되어진 NO_2^-이온을 NiR에 의하여 NH_4^+로 환원시키고 GS, GOGAT 등의 효소에 의하여 무독성의 아미노산으로 동화시키는 방어 메커니즘을 갖고 있다. 그러나 NiR 유전자의 발현은 생물시계의 제어 하에 있고 이들의 유전자의 발현은 야간에 저하한다. 따라서 식물에 유해한 NO_2^-이온이 축적되어지고 이로 인하여 식물은 해를 입게된다. 따라서 이러한 생물시계 제어 하에 있는 nitrite reductase유전자를 조작하여 항상 발현시킴으로써 수목의 NO_2정화능력을 향상시킬 수 있을 것으로 제안되었다.

유전공학 및 식물 조직배양 기법을 이용하여 식물체를 형질전환 시킬 수 있는 기술은 최근에 급격히 발달하기 시작하였으며 궁극적으로 농업 생물 공학, 농업 신 소재 개발, 자연자원 보전을 위한 연구, 그리고 환경보전을 위한 연구 등의 연구 영역으로 확대, 강조되어질 전망이다. 이미 선진국에서는 이와 같은 기술을 이용하여 충해(insect pests)에 저항성이 있는 식물의 개발, 내병성 식물의 개발, 제초제 저항성 식물의 개발, 가뭄이나 고농도의 염에서도 견딜 수 있는 식물의 개발, 영양적 가치가 증진된 식물 개발 등에 많은 관심을 가지고 집중 투자 하고 있다. 국내에서도 몇몇

실험실에서 상기와 같은 목적으로 연구가 진행 중인 것으로 알려져 있으나 아직 초기 단계의 연구라 생각된다. 특히 환경정화용 식물 개발에 관한 국내보고는 아직 없으며 환경오염의 심각성에 비추어 앞으로 이에 관한 집중적인 연구가 요망된다고 하겠다.

본 연구는 환경 공해 물질인 중금속을 중심으로 이에 대한 내성이 가장 큰 식물을 개발함과 동시에 선발 식물에서의 중금속 흡수 기작과 환경오염 물질에 대한 식물의 반응 기작을 밝히고, 형질 개량된 식물을 응용 오염된 현지에 재배하여 식물의 환경 정화 능력을 검정하고자 한다.

제 1 장 환경오염 정화수목의 선발과 균근균을 이용한 오염물질 정화능력 향상

서울대학교 산림자원학과
연구책임자 : 현 정 오
연 구 원 : 이 경 준
연 구 원 : 한 심 희
연 구 원 : 조 덕 현
연 구 원 : 홍 봉 기
연 구 원 : 박 재 형

第 1 節 緖 說

중금속은 자연적으로는 바위나 토양 광물의 풍화에 의해서 발생되지만 대부분 생물이 이용할 수 없는 형태이며, 낮은 농도로 존재한다. 그러나 공장에서 발생되는 산업 폐기물과 가정에서 발생되는 각 종 쓰레기 등과 같이 인간의 활동에 의해서 환경에 방출된 중금속들은 농도가 매우 높은 상태로 존재한다. 납의 경우, 자연 발생 과정에 의해서 발생되는 양보다 인간의 활동에 의해서 생태계로 유입되는 양이 약 100 배정도 많다(Ross, 1994). 생태계로 유입되는 중금속의 인위적인 배출원은 광산과 제련소, 공장, 자동차, 농업용 살충제, 쓰레기 등으로 구분할 수 있는데, 최근 국내에서는 폐광지와 소각로의 증가로 주변 토양에서의 중금속 농도가 매우 높게 나타나 사회적으로 문제가 되고 있다.

중금속 중 일부는 생물이 살아가는데 필수 미량원소로서 이용되기도 하지만 이들이 지나치게 높은 농도로 토양에 축적된 경우는 동물뿐만 아니라 식물 및 미생물의 생육에 큰 영향을 준다. 식물에서 중금속에 의한 피해는 이온 수송계와 같은 분자들의 기능성 그룹의 방해, 생물학적 분자들과 기능성 세포로부터 필수 금속 이온들을 대체 또는 치환, 그리고 효소의 활성 저하 등이 발생된다(Ochiai, 1987). 이러한 중독작용은 광합성 능력의 저하, 잎의 괴사 및 황화현상과 같은 생리적인 문제를 일으킨다. 그러나 식물체는 중금속의 독성에 대한 내성 기작을 보유하고 있으며, 이들은 크게 두 가지로 구분할 수 있는데(Baker, 1981), 이것은 중금속 결합단백질(phytochelatins)의 생성을 통하여 중금속 독성을 제거하는 저항성(Cumming과 Tomsett, 1992)과 균근근의 감염을 통하여 독성 중금속이 식물 체내의 조직으로 유입되는 것을 방지하는 기피성이다(Levitt, 1980; Colpaert와 Van Assche, 1992). 즉 이러한 두 가지의 내성 기작을 통하여 식물은 오염된 토양내에서도 생존이 가능하며, 어떤 식물은 체내 조직에 다량의 중금속을 축적하여 토양내의 중금속을 제거하는데 기여하기도 한다.

균근균은 균사의 표면적이 크고, 중금속 이온과 친화도가 높은 기질과 접촉하고

있기 때문에 토양에 존재하는 중금속 흡수능력이 우수하다(Markert, 1993). 또한 중금속에 대한 내성이 높아 식물의 중금속 스트레스를 감소시켜 기주식물을 보호한다(Morselt 등, 1986; Brown과 Wilkins, 1985b). 그러나 중금속 함량이 높은 환경에서는 균근의 형성이 억제되어, 균과 식물의 공생관계에 해를 미칠 수 있다(Jones과 Hutchinson, 1986).

그러나 고등식물에서 심한 독성 증상을 보이는 중금속 농도에서조차 균은 어떠한 병징도 나타나지 않는데, 이것은 내성이 있음을 나타내며, 독성이 나타나는 농도가 더 높을 가능성이 있음을 보여준다. 어떤 균근균은 수은광산의 토양에 존재하는 수은 농도의 63배까지 축적한다(Bargagli와 Baldi, 1984).

최근 이러한 식물의 내성 기작을 이용하여 오염된 토양을 정화하고 식생을 복원하고자하는 노력이 시도되고 있으나(Brown 등, 1994; Salt 등, 1995), 국내에서는 이에 대한 연구가 매우 부족한 실정이며, 초본식물에 대한 중금속 흡수특성에 대한 연구는 비교적 많으나(정기채 등, 1993; 김성조와 백승화, 1994) 목본 식물에 대한 연구는 국내에서는 물론 국외에서조차 매우 부족한 실정이다. 또한 균근균의 특성을 이용하여 오염지의 식생을 복원하고, 환경오염 정화 특히 중금속 오염지 정화 능력을 증진시키기 위한 연구들이 진행되고 있다(Haselwandter와 Bowen, 1996). 그러나 국내에서는 아직까지 이와 관련된 연구가 매우 부족하다.

따라서 본 연구는 목본식물을 대상으로 중금속에 대한 흡수 특성과 토양 내 축적된 중금속의 농도와 조직 농도와의 상관관계를 밝히고, 중금속에 대한 균근균의 내성, 축적 특성 및 중금속에 대한 균종별 생장 특성을 파악하고자 하였다. 또한 균 접종을 통한 수목에서의 중금속 흡수 능력 및 생리적인 특성 등의 연구를 통해 중금속 흡수 능력을 향상시키는 기술을 개발하여, 향후 목본식물을 중금속 오염지의 토양 정화 및 식생 복원에 이용하기 위한 자료를 제공하고자 하였다.

第 2 節 材料 및 方法

1. 폐광산 주변 토양의 중금속 오염 및 수목의 중금속 축적 현황

가. 조사대상지 개황

본 연구는 경기도 화성군 봉담면 상2리에 위치한 삼보광산(아연)과 경기도 광명시 가학동에 위치한 가학광산(아연)을 조사대상지로 선정하여 1997년 4월부터 9월까지 조사하였다.

삼보광산은 1975년 5월부터 채광을 시작하여 1991년 3월에 폐광되었다. 광구에서 50m 거리에 광미사가 쌓여 있었으며, 현재는 복토된 상태이다. 식생은 평균흉고직경 18cm, 평균수고 11m의 현사시나무(*Populus alba*×*glandulosa*)와 평균흉고직경 14cm, 평균수고 11m의 리기다소나무(*Pinus rigida*)가 주로 식재되어 있었고, 교목은 굴참나무(*Quercus variabilis*), 소나무(*Pinus densiflora*)등이 있었고, 소교목은 난티잎개암나무(*Corylus heterophylla*), 생강나무(*Lindera obtusiloba*), 때죽나무(*Styrax japonicus*), 팥배나무(*Sorbus alnifolia*)등이 나타났으며, 관목은 진달래(*Rhododendron mucronulatum*)가 있었다.

가학광산은 1912년에 채광을 시작하였고, 1973년에 폐광되었다. 광미사는 광구를 중심으로 1Km 정도의 거리에 쌓여 있었고, 광미사의 양은 297,419m3로 추정되며, 현재는 복토된 상태이다. 광구 주변은 평균흉고직경이 9cm, 평균수고 13m의 아까시나무(*Robinia pseudoacacia*)가 주로 식재되어 있었으며, 교목으로는 소나무, 신갈나무(*Quercus mongolica*), 상수리나무(*Quercus acutissima*)등이 있었고, 소교목은 난티잎개암나무와 팥배나무, 관목으로는 진달래가 있었다.

나. 토양내 중금속 농도 측정

토양내 중금속 농도를 측정하기 위한 시료는 1997년 9월에 광구로부터 50m, 500m, 1500m, 4000m의 거리에서 각각 4개의 조사구를 선정하고, 각 조사구에서 0

15cm 깊이의 토양을 각각 5점씩, 거리별로 총 20점을 채취하였으며, 채취된 토양 시료는 2mm 체를 통과시킨 후 대기 중에서 건조하였다. 건조된 토양은 시료 10g에 0.1N HCl 50ml를 첨가하여 한시간 동안 교반한 후 24번 여과지를 이용하여 여과하고, 그 여액을 분석 시료로 사용하였다(農林水産技術協議事務局, 1972a, b). 중금속(Cd, Cu, Zn, Pb)은 원자흡광법(AA6401F SHIMADZU)을 이용하여 측정하였다.

다. 식물체내 중금속 축적 농도 측정

식물체는 토양시료를 채취한 조사구에서 공통으로 존재하는 수종인 현사시나무, 난티잎개암나무, 리기다소나무, 진달래, 아까시나무 5년생 미만의 어린 나무를 대상으로 1997년 9월에 각 조사구에서 3개체씩을 채취하였으며, 실험실로 옮긴 후 흙을 털어내고 증류수로 깨끗이 세척한 후 70℃의 건조기에서 24시간 건조하였다. 건조된 나무는 잎, 가지, 뿌리로 구분하였으며, 분쇄기를 이용하여 마쇄한 후 60mesh를 통과한 것을 분석용 시료로 이용하였다. 각 시료 2g에 ternary solution(HNO3 : HClO4 : H2SO4 = 10 : 4 : 1) 20ml를 첨가한 후 180 210℃의 가열판 상에서 가열 분해하고, 분해액이 무색 투명할 때 분해가 종료된 것으로 하였다. 분해가 완료된 시료는 가열판상에서 내려 냉각하여 건고시킨 후 증류수 50ml로 완전히 용해시키고, 원자흡광법(AA6401F SHIMADZU)을 이용하여 중금속의 농도를 측정하였다(農林水産技術協議事務局, 1972c). 측정된 결과는 수종별, 부위별, 광구로부터 거리별로 구분하여 분석하였다.

2. 외생 균근균의 중금속에 의한 내성 특성

가. 공시균종

본 연구에 사용한 외생균근균은 모래밭버섯(*Pisolithus tinctorius*), 졸각버섯(*Laccaria laccata*), 황소비단그물버섯(*Suillus bovinus*), 비단그물버섯(*Suillus luteus*)으로서 American Type Culture Collection에서 1997년 8월에 도입된 균주를 서울대학교 산림자원학과 수목생리학 연구실에서 계대배양하여 보관해 오던 것을 사용하였다.

나. 균 배양 및 중금속 처리

각 균근균의 중금속 내성과 축적 능력을 평가하기 위하여, MMN(Modified Melin-Norkrans) 배지(Marx, 1969)에 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $PbCl_2$ 용액을 0 ppm, 50 ppm, 200 ppm 농도로 첨가하였다. 각 처리는 5 반복으로 실시하였다. MMN 배지의 기본 pH는 5.8이었는데, 앞의 중금속 용액을 첨가한 후의 pH는 변화되지 않았다.

MMN 배지에서 계대배양해 두었던 균주에서 생장이 왕성한 가장자리 부분만을 골라 대략 3×3 mm크기로 절단하고, 직경 9cm의 Petri dish내 배지의 중앙부에 치상하였다. 배양은 균 치상 후에 24℃에서 52일간 실시하였다.

다. 생장속도 측정과 내성 지수 계산

균사의 생장속도는 중심에서 부터 4방향으로 길이를 측정하였다. 균사를 치상한 후에 균사가 새로운 배지에 적응할 여유와 생장하는 속도를 고려하여, 모래밭버섯균은 4일째 부터, 황소비단그물버섯균은 9일째부터, 졸각버섯균과 비단그물버섯균은 11일째부터 대략 5일 간격으로 측정하였으며, 각 측정치를 이용하여 colony area를 계산하였다. 계산된 colony area를 이용하여 각 균종별 일일 생장량을 계산하였으며, 대조구와 각 중금속 처리구의 생장량 비를 이용하여 내성지수를 계산하였다(Colpaert와 Van Assche, 1987).

$$\text{내성지수(Tolerance Index : TI)} = \frac{\text{처리구의 생장속도}}{\text{대조구의 생장속도}} \times 100$$

각각의 계산된 값을 이용하여 균종별, 중금속 처리별 생장 특성 및 내성특성을 비교 분석하였다.

라. 중금속 농도 측정

균사 내에 축적된 중금속 농도를 측정하기 위하여, 배양된 균사를 배지로 부터

분리하여 증류수로 세척한 후 건조시켰다. 시료의 분해 및 농도 측정은 식물체 분석과 동일한 방법으로 실시되었다.

3. 균근균이 접종된 4종 포플러의 중금속 흡수 능력 및 생리적 특성

가. 포플러의 삽목과 균근균의 접종

포플러의 삽목묘에 균근균을 접종하기 위하여 지속적으로 계대배양 된 모래밭버섯균(*Pisolithus tinctorius*)을 이용하였다. 모래밭버섯균은 vermuculite와 peat moss를 7:3으로 배합한 기질에 MMN 배지를 혼합한 후 배양병 넣고, 24 28℃의 incubator에서 40일간 배양하였다.

수목은 현사시나무(*Populus alba×glandulosa*), 수원포플러(*Populus koreana×nigra var. italica*), 양황철(*Populus nigra×maximiwiczii*), 이테리포플러(*Populus euramericana*)를 15cm 정도의 삽수를 제조하여 저온에 저장하였다.

균근 접종은 peat moss, vermiculite, 모래, 묘포 토양을 각각 1:1:1:1로 혼합한 배지와 배양된 균근을 혼합하여 포트에 넣고, 삽수를 심었다.

각 실험구는 대조구, 균근균 접종구, 중금속처리구(Cd 30ppm, Cd 80ppm, Pb50ppm, Pb300ppm), 균근균 접종 + 중금속 처리구(Cd 30ppm, Cd 80ppm, Pb50ppm, Pb300ppm)로 총 10개의 처리를 실시하였으며, 각 처리구에 따라 4종 포플러를 10반복을 실시하였다.

나. 균근균 접종 삽목묘의 중금속 흡수 능력 및 생리적 특성

균근균이 접종된 포플러 삽목묘는 초기 삽목 후 2개월 정도 뿌리가 활착되도록 유지하였고, 개엽과 줄기 생장이 시작되는 시점을 중심으로 중금속 처리를 실시하였다. 중금속은 3일에 한번 정도 각 포트마다 각각 200ml의 중금속 용액을 처리하였으며, 중금속 용액은 Pb(PbCl2), Cd(3CdSO4·8H2O)로 제조되었다.

처리가 진행되는 동안 Li-6400 휴대용 광합성 측정기(LI-COR, USA)를 이용하여

광합성 능력을 측정하였으며, 색소함량은 DMSO로 잎을 추출하여 엽록소 및 카로테노이드의 농도를 측정하였다(Hiscox and Israelstam, 1979), 또한 Aacid phosphatse(Macfall, et al, 1991), nitrate reductase(Hogberg et al, 1986)의 활성을 측정하였다. 생장이 완전히 정지된 후, 각 처리별로 3개체를 수확하여 증류수를 이용하여 세척하여 분석 시료로 이용하였다. 각 시료는 잎, 줄기, 뿌리로 구분하여 70℃에서 48시간 동안 건조시킨 후 생체량을 측정하였으며, 각 개체별 중금속 축적 농도를 측정하여 각 처리별로 비교하였다.

다. 균근균 접종 포플러 1년생 묘의 이식

균근균이 접종된 1년생 포플러 묘목의 일부는 인위적으로 중금속이 처리된 토양에 이식되었으며, 생장이 거의 정지되는 10월에 지상부를 수확하여 생체량을 측정하였으며, 각 수종별, 처리별로 비교하였다.

第 3 節 結果 및 考察

1. 폐광산 주변 토양의 중금속 오염 및 수목의 중금속 축적 현황

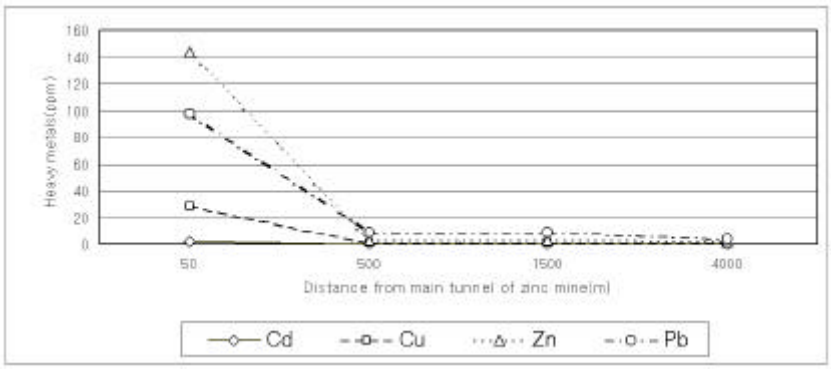
가. 토양내 중금속 농도

Figure 1에 나타난 것과 같이 삼보광산과 가학광산에서 채취된 토양 중금속 농도는 광구 근처에서 높은 경향을 보였으며, 광구에서 멀어질수록 농도는 낮게 나타났다. 특히 광구로부터 50m 거리내 중금속 농도가 28 143ppm으로 매우 높은 수준이지만 500m이상의 거리에서는 30ppm이하로 낮은 수준이었다. 50m내의 거리에서 토양내 4종 중금속 중 가장 높은 농도를 보여준 것은 Zn으로 삼보광산과 가학광산에서 각각 142.9ppm과 51.7ppm이었으며, Pb은 97.1ppm과 45.1ppm, Cu는 28.0ppm, 27.7ppm이었으며, Cd은 각각 1.85ppm과 1.05ppm으로 가장 낮은 값을 보였다.

토양에서의 정상적인 중금속 농도의 범위 중 Cd은 0.01 7ppm, Cu는 2 100ppm, Zn은 10 300ppm, Pb은 2 200ppm으로 제시되었고(Ross, 1994), 토양에서 독성반응이 나타난다고 판단되는 농도는 Cd은 3 8ppm, Cu는 60 125ppm, Zn은 70 400ppm, Pb은 100 400ppm으로 제시되었다.(Kabata-Pendias와 Pendias, 1984).

이러한 기준에 비교해 볼 때 두 광산지역내 토양은 중금속의 오염도가 크지 않다고 판단되는데, 광산이 폐광된 후, 시간이 흐르면서 중금속 농도가 용탈에 의해 희석되었을 것으로 생각된다. 그러나 삼보광산의 경우 일부 중금속에 대한 오염 수준이 유지되고 있으며, 특히 광구에서 가까운 거리인 50m에서도 오염정도는 독성을 나타낼 수 있는 농도의 50%정도 수준이었다. 또한 삼보광산에서의 Zn, Pb농도는 각각 142.9ppm, 97.1ppm으로 독성이 나타날 수 있는 수준에 있음을 보여 주고 있다.

(A)



(B)

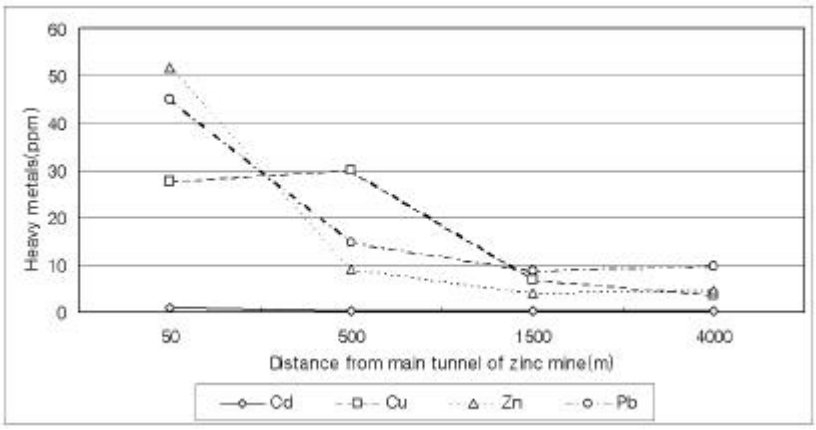


Figure 1. Average concentration of heavy metals in soil at various distance from main tunnel of Sambo(A) and Gahak Zinc Mines(B)

나. 각 수종별 중금속 농도 비교

삼보광산 전체에서의 수목 중 평균 중금속 농도를 비교한 결과, 각 수종별 차이가 크게 나타났다(Table 1). 수종별로는 현사시나무가 Pb를 제외한 모든 중금속에서 가장 높은 농도를 보였는데, Cd, Cu와 Zn의 농도는 각각 6.4ppm, 14.1ppm과 68.2ppm이었다. Pb의 경우는 리기다소나무가 가장 높은 농도인 7.8ppm을 보였으며,

수종에 따른 차이는 크지 않았다. 수목 중에 축적된 중금속들 중 Zn이 가장 높은 농도를 보여 주었으며, 다음은 Cu, Pb, Cd의 순으로 나타났다.

가학광산에서의 수목 중 중금속 농도는 Cd과 Zn에서 수종별로 차이가 있음을 보였으나, Cu와 Pb에서는 수종에 따른 차이를 보이지 않았다(Table 1). Cd의 경우 현사시나무가 가장 높은 농도인 1.6ppm을 나타내 다른 수종보다 2배에서 5배의 높은 농도를 보였으며, Zn의 경우도 현사시나무에서 가장 높은 농도인 71.5ppm을 나타내었다. Cu와 Pb은 난티잎개암나무에서 가장 높은 농도인 31.5ppm과 13.6ppm을 보여주었다. 중금속류 중의 식물체내 농도는 Zn이 가장 높았고, Cu, Pb, Cd의 순으로 삼보광산의 결과와 일치하였다.

식물에서의 중금속 농도의 정상적인 범위는 Cd이 0.2 0.8ppm, Cu가 4 15ppm, Zn이 8 400ppm, Pb이 0.1 10ppm 정도이며(Ross, 1994), 오염된 식물내에서의 중금속 농도는 Cd이 5 30ppm, Cu가 20 100ppm, Zn이 100 400ppm, Pb이 30 300ppm으로 제시되었다(Kabata-Pendias와 Pendias, 1984). 본 연구에서 조사된 수종 중 Cd에 대한 오염으로 판단되는 식물은 삼보광산의 현사시나무로 볼 수 있으며, 최대농도는 19.7ppm까지의 높은 농도를 보였다. 다른 수종은 크게 오염되지 않은 것으로 판단된다. Cu의 경우는 대부분의 수종에서 20ppm을 넘는 경우가 있었으며, 가학광산에서 채취된 수종 중 난티잎개암나무는 최대 84.3ppm까지 나타났다. Zn의 경우는 대부분의 수종이 오염된 정도는 아니지만 삼보광산의 현사시나무는 최대 96.2ppm까지의 농도를 보여주었다. Pb의 경우는 삼보광산의 리기다소나무가 최대 58.2ppm, 가학광산의 난티잎개암나무가 81.2ppm, 아까시나무가 49.2ppm까지의 농도를 나타내 오염 수준을 보여 주었다.

생태계에서의 중금속의 분포에 영향을 주는 인자는 대기의 침적, 슬러지 처리, 광물의 풍화와 같은 중금속 유입 특성과 식생 특성, 토양 특성이 있으며, 식생 특성은 수관의 형태와 밀도, 잎의 특성, 근권의 영향, 식물종간의 중금속 흡수차에 의해 영향을 받는다(Ross, 1994).

Table 1. Average heavy metal concentration(ranges in parenthesis) of leaves, branches, and roots for five tree species at Sambo and Gahak Zinc Mines

(unit : ppm)

Site	Species	Cd	Cu	Zn	Pb
Sambo	*Corylus heterophylla*	0.74b* (0.13 2.37)	11.23a(5.31 17.37)	50.56ab(15.84 79.78)	2.71a(0.19 7.03)
	Pinus rigida	0.95b (0.07 3.65)	9.31a (4.20 23.12)	44.88b(23.23 92.87)	7.83a(0.89 58.16)
	Populus alba×glandulosa	6.44a (0.1 19.71)	14.14a(4.20 35.20)	68.20a(37.37- 96.24)	3.10a(0.95 11.33)
	Rhododendron mucronulatum	0.46b (0.23 0.78)	9.21a (4.89 21.10)	46.01b(16.44 73.93)	2.47a(0.58 10.19)
Gahak	*Corylus heterophylla*	0.64b (0.27 1.66)	31.5a (10.88 84.29)	59.17ab(31.70 74.92)	13.63a(4.14 81.24)
	Pinus rigida	0.67b (0.54 0.73)	10.84a(8.32 14.34)	50.22b(41.10 56.61)	3.80a(3.69 3.94)
	Populus alba×glandulosa	1.62a (0.66 2.96)	23.61a(12.34 41.58)	71.49a(61.03 79.40)	4.45a(3.27 5.79)
	Rhododendron mucronulatum	0.38b (0.12 1.34)	18.82a(7.31 41.34)	53.62b(35.55 71.68)	4.92a(2.52 9.04)
	Robinia pseudoacacia	0.81ab(0.11 3.93)	21.51a(7.00 56.44)	58.09ab(25.67 78.98)	8.43a(3.11 49.19)

* Means within the same metal with different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$.

다. 각 수종의 부위별 중금속 농도

일반적으로 수목에서 중금속 농도는 뿌리> 잎> 가지> 줄기의 순으로 나타나며 (Adriano, 1986), **다른 조직간의 따른 중금속 분포는 목부의 수송 특성에 따라 다르게 나타난다**(Garland 등, 1981).

식물에서의 중금속 분포는 뿌리와 지상부간 균일하게 분포하는 종인 Zn, Mn, Ni, B**과 줄기보다 뿌리에 더 많이 분포하거나 때로는 줄기에 다량으로 분포하는** Cu,

Cd, Co, Mo, 그리고 줄기에는 매우 적으며, 뿌리에 대부분 분포하는 Pb, Sn, Ti, Ag, Cr, V의 세가지 범주로 구분할 수 있다. 그러나 이러한 범주는 식물의 종과 토양내 농도가 높은 경우 변화될 수 있다(Adriano, 1986).

삼보와 가학광산의 전체에서 각 수종들의 부위별 평균 중금속 농도의 경우(Table 2), 삼보광산에서 난티잎개암나무는 Cd을 제외한 다른 중금속에서는 부위별로 큰 차이를 보이지 않았으며, 뿌리에서 가장 높은 농도인 1.30ppm을 보여 주어 잎이나 줄기보다 3 4배 높은 농도를 나타내었다. 리기다소나무의 경우 부위별 차이를 나타내는 중금속은 없었으나, Pb의 경우 뿌리가 잎과 줄기보다 9배정도 높은 농도인 18.7ppm을 보였다. 현사시나무의 경우 Zn에서 부위별 차이를 보여주었는데 잎에서 가장 높았고, 줄기와 뿌리 순으로 중금속 농도를 보였다. 또한 Cu와 Cd도 잎에서 높은 농도를 보였다. 진달래의 경우는 부위별 차이를 보이지 않았다. 그러나 Zn과 Pb의 경우 뿌리에서 높은 농도를 나타내었다. 식물 뿌리의 Zn 함량과 농도는 뿌리 영역에서의 Zn 이용도에 의해 영향을 받으며, 독성 수준에서는 뿌리에 높은 비율로 축적되나 적당한 수준에서는 잎에 축적된다. 줄기에서의 Zn 농도는 줄기의 체적이 크기 때문에 반드시 높게 나타나지는 않는다(Robson, 1993).

가학광산에서 채취된 식물체 중의 부위별 중금속 농도는 수종에 따라 약간의 차이를 보여주었다. Cd, Cu, Pb의 경우, 대부분의 수종은 뿌리에서 높은 농도를 나타냈으나, 현사시나무는 잎에서 높은 농도를 보였다. Zn의 경우는 부위별 분포의 차이가 뚜렷하지 않았으나 주로 줄기와 잎에서 높은 농도를 보였다. 각 수종의 부위별 분포에 차이를 보이는 것은 현사시나무의 Cu 농도와 진달래의 Cd, Cu 농도였다. 특히 진달래는 뿌리에서 Cd과 Cu가 높은 농도를 나타내었으며, 현사시나무는 잎에서 Cu의 농도가 높게 나타났다. 식물 뿌리에 의한 Cu의 흡수 속도는 필수원소 중 가장 낮으며, 흡수 과정은 능동적 특성을 나타내며, Cu는 일단 흡수되면 뿌리가 독성에 의해 손상되는 경우에도 뿌리에 축적된다(Adriano, 1986).

외국의 예에서, 수목에 대한 각 부위별 중금속은 수피에서 Pb, Zn가 높은 농도를 보였고, 너도밤나무에서 측정된 Cd 농도는 잎에서 가장 높았으나, Cu의 농도는 Pb, Zn, Cd의 농도보다 모든 부위에서 변이가 적은 것으로 보고된 바 있다(Heinrichs와

Mayer, 1980).

Table 2. Average concentration(± sd) of heavy metals in leaf(L), branch(B) and root(R) of five tree species at Sambo and Gahak Zinc Mines.

(unit: ppm)

Site	Species	Plant parts	Cd	Cu	Zn	Pb
Sambo	*Corylus heterophylla*	L	0.34 ± 0.20b	12.0 ± 2.65a	43.20 ± 15.45a	3.09 ± 2.58a
		B	0.57 ± 0.42ab	9.72 ± 0.69a	51.29 ± 24.04a	2.41 ± 1.57a
		R	1.30 ± 0.84a	11.98 ± 5.21a	57.20 ± 29.89a	2.62 ± 2.95a
	Pinus rigida	L	0.71 ± 0.75a	9.20 ± 2.39a	47.37 ± 18.47a	2.54 ± 1.53a
		B	1.37 ± 1.57a	8.44 ± 2.27a	45.83 ± 19.72a	2.22 ± 0.91a
		R	0.76 ± 0.96a	10.27 ± 8.68a	41.43 ± 34.31a	18.73 ± 6.79a
	Populus alba×glandulosa	L	10.79 ± 9.05a	20.74 ± 11.83a	91.00 ± 5.61a	3.16 ± 3.00a
		B	2.29 ± 1.89a	14.73 ± 13.90a	50.06 ± 10.47ab	1.74 ± 0.80a
		R	6.28 ± 6.21a	8.60 ± 3.70a	64.70 ± 20.54b	4.07 ± 4.04a
	Rhododendron mucronulatum	L	0.35 ± 0.14a	9.42 ± 1.28a	49.33 ± 14.06a	2.31 ± 2.54a
		B	0.51 ± 0.22a	10.16 ± 7.46a	37.37 ± 24.46a	1.65 ± 1.48a
		R	0.51 ± 0.26a	8.05 ± 3.31a	51.33 ± 19.86a	3.46 ± 4.49a
Gahak	*Corylus heterophylla*	L	0.41 ± 0.14a	22.17 ± 9.10a	52.68 ± 5.04a	5.58 ± 1.28a
		B	0.65 ± 0.28a	18.06 ± 10.09a	70.13 ± 1.88a	4.91 ± 0.81a
		R	0.87 ± 0.71a	54.28 ± 38.49a	54.70 ± 21.74a	30.38 ± 4.05a
	Populus alba×glandulosa	L	2.06 ± 1.27a	40.01 ± 2.22a	78.44 ± 1.36a	4.87 ± 1.31a
		B	1.80 ± 0.74a	16.24 ± 5.51b	69.74 ± 3.59a	3.68 ± 0.57a
		R	1.01 ± 0.49a	14.58 ± 2.66b	66.30 ± 7.45a	4.80 ± 1.24a
	Rhododendron mucronulatum	L	0.19 ± 0.06b	13.13 ± 1.65b	54.04 ± 9.81a	4.21 ± 1.25a
		B	0.27 ± 0.05ab	14.84 ± 6.26ab	60.85 ± 9.53a	4.98 ± 1.01a
		R	0.67 ± 0.48a	28.51 ± 13.81a	45.95 ± 9.74a	5.59 ± 2.37a
	Robina pseudoacacia	L	0.66 ± 0.58a	15.70 ± 4.63a	60.13 ± 21.72a	4.19 ± 1.15a
		B	0.59 ± 0.58a	23.00 ± 22.42a	58.10 ± 22.96a	5.80 ± 2.23a
		R	1.18 ± 0.84a	25.83 ± 21.39a	56.05 ± 19.61a	4.22 ± 0.51a

* Means with different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$.

라. 토양 중금속과 수목의 중금속 농도간의 상관관계

Table 3에 나타낸 것처럼 대부분 수목의 조직내 중금속 농도는 토양내의 중금속

농도와 정의 상관을 나타냈는데, Cd은 리기다소나무, 현사시나무, 아까시나무에서 높은 정의 상관을 보였다. Cu와 Zn은 난티잎개암나무, 리기다소나무, 진달래에서 정의 상관을 나타냈는데, 난티잎개암나무와 진달래의 상관계수는 Cu와 Zn 모두에서 비교적 낮은 값을 보여 주었다. 특히 리기다소나무는 Pb를 제외한 Cd, Cu, Zn에서 가장 높은 상관계수를 나타내서 토양 오염 정도를 가장 잘 반영하는 수종으로 생각된다. Pb은 현사시나무, 진달래, 아까시나무에서 정의 상관을 나타냈으나 비교적 낮은 값을 보였다. 토양에서의 중금속 농도는 식물에서의 중금속 농도와 매우 높은 상관을 보이는데, 가장 높은 상관을 보이는 것은 Zn, Cd, 그리고 Cu로 0.884, 0.883, 0.875의 상관 계수를 보여주었으며, Pb은 비교적 낮은 상관(r=0.517)을 나타내는 것으로 보고하였다(Ross, 1994). 이러한 결과는 토양내 중금속의 농도가 식물체내의 중금속 농도에 영향을 미치고 있음을 보여준다.

Table 3. Correlation coefficients between heavy metal concentration of soil and that of plant tissue in five tree species

Species	Cd	Cu	Zn	Pb
Corylus heterophylla	0.31	0.52*	0.53**	0.19
Pinus rigida	0.88**	0.72*	0.88*	0.53
Populus alba×glandulosa	0.83**	0.38	0.28	0.77**
Rhododendron mucronulatum	0.21	0.45*	0.60**	0.57**
Robina pseudoacacia	0.87**	0.47	0.40	0.59*

* means statistically significant at 5% level and ** means statistically significant at 1% level

Chamberlain(1983)은 식물체내의 중금속 농도와 토양내 중금속 농도간의 상관관계를 알아내기 위하여 식물과 토양의 중금속 농도비(Concentration factors: CF)를 이용하였다.

Table 4에 나타난 CF값은 본 실험에서 얻은 결과를 이용하여 계산된 것으로 수

종에 따라 약간의 차이가 있지만, Zn가 가장 높은 CF값을 보였고, Pb가 가장 낮은 CF값을 보여주어서 Harrison과 Chirgawi(1989a, b)의 연구 결과와 일치하였다. 특히 현사시나무와 아까시나무의 경우는 Zn의 CF값과 Cd의 CF값이 유사하게 나타났으며, 난티잎개암나무, 리기다소나무, 진달래에서의 각 중금속별 CF값은 Zn>Cu>Cd>Pb의 순으로 나타났다. 5개 수종 중 현사시는 Cd, Cu, Zn에서 가장 높은 CF값을 보여서 중금속의 흡수 및 축적 능력이 가장 뛰어났다.

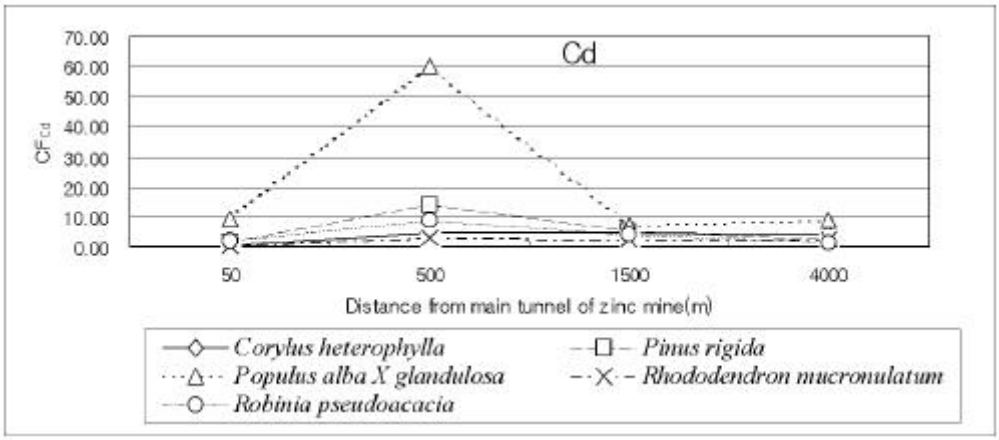
Table 4. The ratios of heavy metal concentration of plant tissue to that of soil(concentration factors : CF) of five tree species

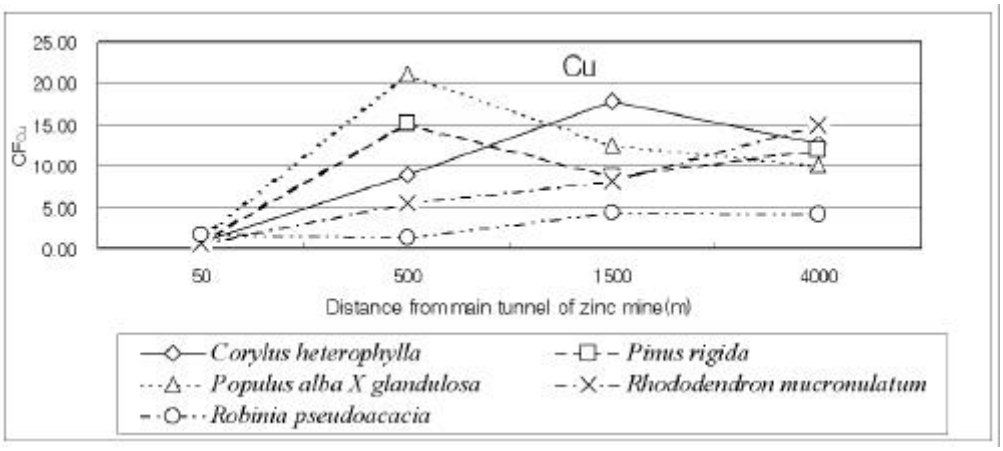
Species	Cd	Cu	Zn	Pb
Corylus heterophylla	3.50(0.52 7.54)	8.89(0.44 21.55)	13.63(0.52 36.35)	0.38(0.06 0.69)
Pinus rigida	5.83(1.37 14.16)	8.99(0.55 15.73)	15.08(0.57 23.11)	1.41(0.23 2.43)
Populus alba×glandulosa	16.93(6.36 59.86)	11.19(0.97 21.40)	16.55(0.56 27.08)	0.39(0.09 0.70)
Rhododendron mucronulatum	2.29(0.25 3.90)	7.32(0.35 23.54)	12.92(0.49 33.03)	0.33(0.07 0.57)
Robina pseudoacacia	4.14(1.43 8.78)	2.91(1.41 4.42)	6.28(1.42 10.69)	0.71(0.37 1.40)

Harrison과 Chirgawi(1989a, b)의 연구 결과에 의하면 각 중금속들간의 CF 값은 Zn>Cd>Ni>Cr>Pb의 순으로 나타나는데, CFZn와 CFCd값이 다른 중금속들 보다 큰 이유는 토양내에서 이들 중금속들의 이동성(mobility)와 생물이용도(bioavailability)가 높기 때문이라고 하였다.

토양과 식생오염을 평가하기 위해서 계산된 CF값은 오염원으로부터의 거리에 따라 큰 변이를 가지며, 일반적으로 CFZn가 CFNi과 CFCu보다 높게 나타난다 (Hutchinson와 Whitby, 1974). .

본 연구 결과에서 광구에서의 거리에 따라 대부분의 중금속이 큰 변이를 보여주었으며, 수종에 따른 차이도 보였으나 대체로 광구 근처에서는 낮은 CF값을 나타냈으며, 광구에서 먼쪽은 CF값이 크게 나타났다 (Figure 2).


Cd
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
CFCd
50
500
1500
4000
Distance from main tunnel of zinc mine(m)
Corylus heterophylla
Pinus rigida
Populus alba X glandulosa
Rhododendron mucronulatum
Robinia pseudoacacia


Cu
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
CFCu
50
500
1500
4000
Distance from main tunnel of zinc mine(m)
Corylus heterophylla
Pinus rigida
Populus alba X glandulosa
Rhododendron mucronulatum
Robinia pseudoacacia

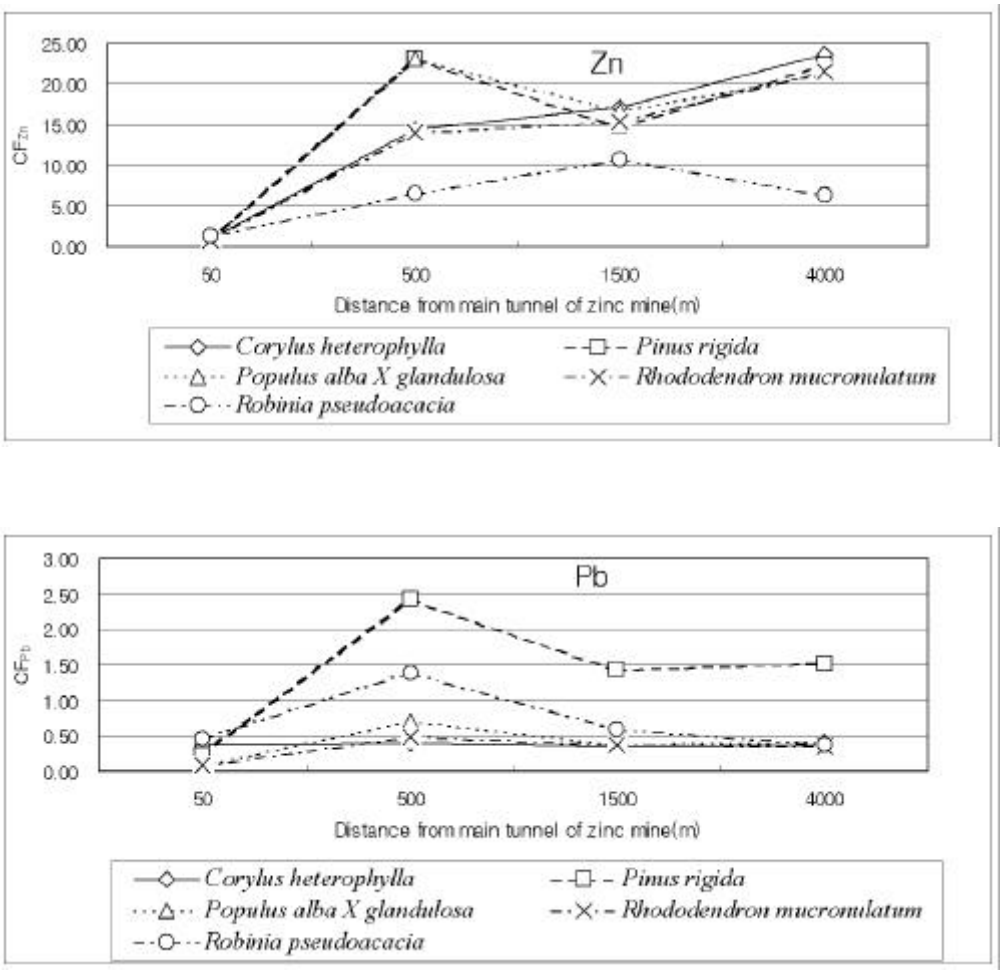


Figure 2. The ratios of heavy metal concentration of plant tissue to that of soil(concentration factors : CF) of five tree species growing at various distance from main tunnel of zinc mines.

2. 외생 균근균의 중금속에 의한 내성 특성

가. 4종 균근균의 중금속 처리별 생장량

Figure 3은 모래밭버섯균의 중금속 처리별 생장속도를 나타낸 것이다. 이 균은 생장속도가 빠르기 때문에 16일 또는 26일 후에 실험을 종료하였다. 대조구는 처리구에 비해 생장이 좋았으며, 16일간 배양 후의 평균 생장량은 6472mm2이었다. 대부분 중금속은 모래밭버섯균의 생장을 저해시켰다. 특히 Cu 200ppm에서는 최초의 생장이 11일부터 시작되는 생장 지연현상이 나타났으며, 26일까지의 총 생장량은 2050mm2로 대조구의 3분의 1수준 이었다.

졸각버섯균은 총 52일간의 배양을 통하여 생장량을 비교하였다(Figure 4). 졸각버섯균은 Pb에 의한 생장저해를 보이지 않았으며, 생장량이 대조구와 유사하였다. 대조구와 Pb 50ppm, Pb 200ppm에서의 생장량은 각각 2082mm2, 1847mm2, 2332mm2이었다.. 그러나 Zn와 Cu에 의한 생장 저해는 컸다. Zn의 경우 50ppm, 200ppm에서 각각 생장량이 808mm2, 994mm2으로 나타나 대조구와는 큰 차이를 보여주었으며, 특히 Cu에서는 50ppm에서 972mm2의 생장량을 보여주었고, 200ppm에서는 생장이 나타나지 않았다.

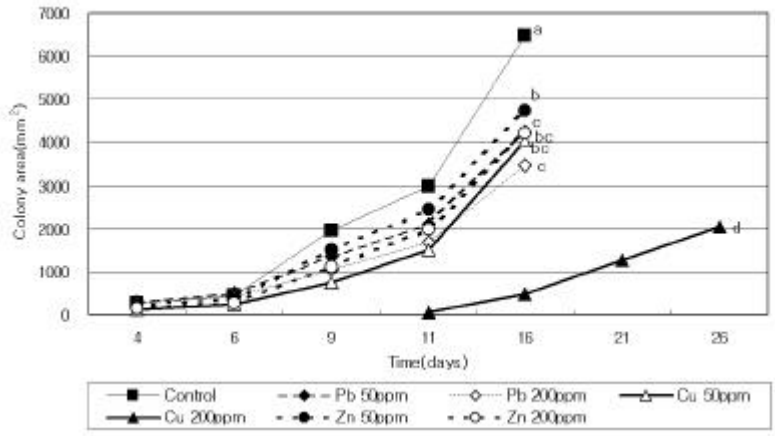


Figure 3. Initial delay and subsequent growth of *Pisolithus tinctorius* at different concentrations of Pb, Cu, and Zn

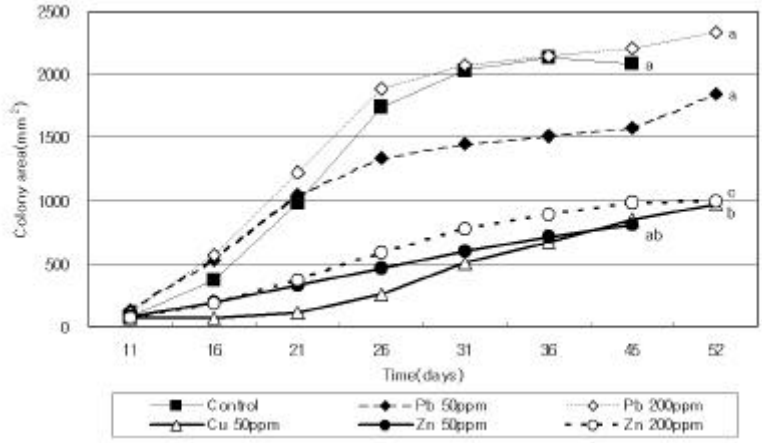


Figure 4. Initial delay and subsequent growth of *Laccaria laccata* at different concentrations of Pb, Cu, and Zn. Growth of *Laccaria laccata* was completely inhibited at 200ppm Cu

황소비단그물버섯균의 생장량은 중금속 처리별로 다양하게 나타났다(Figure 5). 대조구의 생장량은 4945mm2으로 가장 컸으며, Pb는 50ppm, 200ppm에서 각각 4392mm2, 3272mm2의 생장량을 보여주어 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 Zn는 생장이 지연되어 31일부터 생장이 시작되었으며 50ppm, 200ppm에서의 생장량은 각각 4665mm2, 3263mm2으로 단기간내에 Pb처리시와 유사한 정도의 생장을 보였다. Cu는 50ppm에서 21일부터 생장이 시작되는 지연현상이 나타났으며, 52일 후 총 생장량은 477mm2으로 매우 낮았고, Cu 200ppm에서는 생장이 나타나지 않았다.

비단그물버섯균의 중금속처리에 따른 생장량은 Figure 6에 나타내었다. 대조구의 생장량은 2278mm2로 가장 컸으며, Pb 50ppm, 200ppm에서 각각 2070mm2, 2027mm2으로 대조구와 거의 유사하였으며, Pb 농도에 따른 차이는 나타나지 않았다. Zn의 경우 50ppm, 200ppm에서 각각 1440mm2, 1460mm2으로 대조구와 큰 차이를 보였으나, 농도에 따른 차이는 크지 않았다. 이것은 Zn 50ppm에서의 생장이 Zn 200ppm에서 보다 생장이 빨리 정지되었기 때문이다. Cu의 경우는 1420mm2로 Zn와 유사한

정도의 생장을 보였으나, Cu 200ppm에서는 생장이 나타나지 않았다.

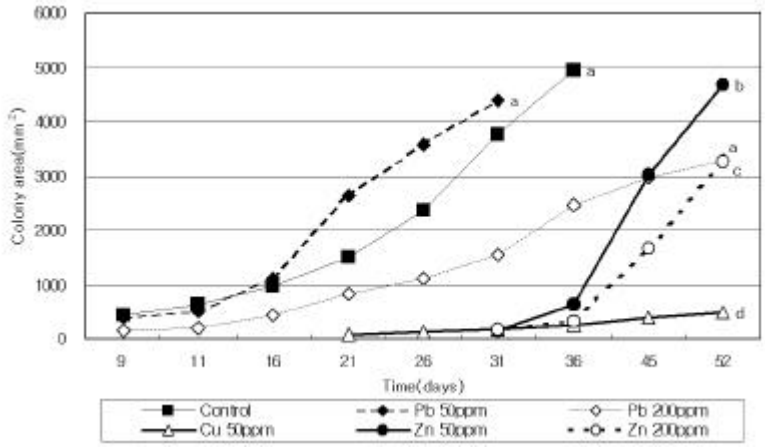


Figure 5. Initial delay and subsequent growth of *Suillus bovinus* at different concentrations of Pb, Cu, and Zn. Growth of *Suillus bovinus* was completely inhibited at 200ppm Cu

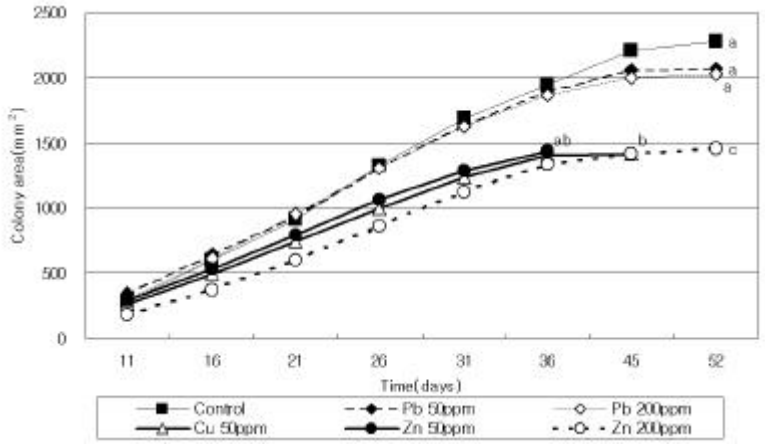


Figure 6. Initial delay and subsequent growth of *Suillus luteus* at different concentrations of Pb, Cu, and Zn. Growth of *Suillus luteus* was completely inhibited at 200ppm Cu

본 연구 결과와 같이 균사의 생장을 완전하게 저해하는 각각의 중금속 농도는 균종간 다르게 나타나며, Pb는 100ppm이하에서 모래밭버섯균의 생장을 저해했으나, *Laccaria laccata*, *Suillus luteus*는 1000ppm에서는 생장이 저해되지 않았고, 7 21일 정도 균사의 생장이 지연되었다는 보고가 있다(McCreight와 Schroeder, 1982).

한천배지를 이용한 연구들은 독성 금속의 농도에 따른 많은 외생균근의 민감도를 결정하기 위해 수행되어 왔으며, 종간에 차이가 있다고 제안하였다(Brown과 Wilkins, 1985a; Colpaert와 Van Assche, 1987, 1992; Egerton-Warburton과 Griffin, 1995; Jones와 Hutchinson, 1988) . 예를들면, *Scleroderma flavidum*은 *Lactarius rufus* 보다 Cu와 Ni에 대해 덜 민감하다는 것을 보여주었고(Jones와 Hutchinson, 1988), *Amanita muscaria*는 다른 외생균근보다 Cd에 덜 민감하다고 보고하였다(Colpaert와 Van Assche, 1992).

나. 중금속 처리에 따른 균종간 일일 생장속도

Table 5에 세 가지 중금속으로 처리한 4종 균근균의 일일 균사생장량을 나타내었다. 무처리구의 경우, 모래밭버섯의 생장이 가장 빠르고, 비단그물버섯의 생장이 가장 저조하였다. 특히 모래밭버섯은 비단그물버섯보다 약 9배 정도 빨리 자랐다.

Pb 처리시의 균의 일일 생장 속도는 모래밭버섯균이 가장 빠른 경향을 보였으며, 생장속도는 50ppm과 200ppm에서 각각 238mm2/day, 216mm2/day이었으며, 비단그물버섯균의 생장이 가장 느린 38mm2/day이었다. 졸각버섯균은 Pb 200ppm에서 Pb 50ppm보다 생장이 좋은 경향을 보였다. 또한 Cu 50ppm에서는 모래밭버섯균이 가장 빠른 생장을 보였으며, 황소비단그물버섯균이 가장 느린 생장(9mm2/day)을 보였다. Cu 200ppm에서의 생장은 모래밭버섯균에서만 나타났으며, Cu 50ppm의 252mm2/day의 생장속도보다 매우 느린 78mm2/day을 나타내었다. Zn에서의 생장속도도 모래밭버섯균이 가장 빠르게 나타났으며, 50ppm, 200ppm에서의 생장속도는 각각 295mm2/day, 264mm2/day를 보였고, 졸각버섯균의 생장속도는 50ppm과 200ppm에서 가장 낮은 각각 20mm2/day와 21mm2/day의 속도를 나타내었다.

중금속에 대한 효과를 파악하기 위한 실험에 있어, 배지의 조성은 매우 중요한 요인이 된다. 이것은 배지의 조성이 중금속의 독성과 이용도를 변화시킬 수 있기 때문이다(Shaw, 1989).

특히 중금속의 독성은 배지의 pH에 따라 변하는데, *Penicillium nigricans*는 산성 배지에서 Cu, Co, Cr등에 대한 내성이 크게 나타나며(Brown과 Hall, 1989), 다른 균은 Cd에 대한 내성이 크게 나타난다. 그러나 많은 균과 actinomycetes는 알칼리 배지에서 Ni과 Pb에 대한 내성이 크게 나타난다(Brown과 Hall, 1989).

액체 배지와 한천배지에서의 금속 민감도 연구의 문제점은 배양과정에서 결합 또는 침전되는 이온이 존재한다는 것이다. Phosphate는 토양 내에서뿐만 아니라 인공배지 내에서도 많은 잠재적 독성 금속들과 쉽게 침전물을 형성하며, 균 배지에서의 농도는 일반적으로 높게 나타난다. *Rhizobium* spp.의 Cd 독성에 대한 phosphate의 영향은 2.1mM phosphate 이상의 농도에서 Cd 독성이 뚜렷하게 감소된 것을 발견했다. 즉, 기내 배양 조건에서 외생균근의 민감성 연구에서 한천 배지를 사용하는데는 다양

Table 5. *In vitro* radial growth rate(mm2day-1±sd) of four ectomycorrhizal fungi treated with Pb, Cu, and Zn

Metal / Species	Control	Pb		Cu		Zn	
		50ppm	200ppm	50ppm	200ppm	50ppm	200ppm
Pisolithus tinctorius	404±7a*	238±58a	216±53a	252±19a	79±11	295±32a	264±16a
Laccaria laccata	57±6c	38±5c	66±9b	18±2c	N.G.	20±1c	21±4c
Suillus bovinus	137±35b	141±11b	66±4b	9±1c	N.G.	93±13b	60±18b
Suillus luteus	44±4c	44±4c	41±2c	35±5b	N.G.	40±2c	29±3c

* Means within the same metal with different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$; N.G. indicates non-growth due to growth inhibition at 200ppm Cu.

한 문제가 발생할 수 있는데, 금속은 기질내에서 결합이 일어나며, 이것은 균이 이용할 수 있는 금속의 농도를 변화시킬 수 있기 때문이다(Hartley 등, 1997).

본 연구 결과와 같이 동일 배지내에서도 종에 따라 생장속도는 크게 다르게 나타나며, 중금속 처리시에 각각의 배지 조건에 따라 중금속에 대한 독성의 효과가 달라질 수 있음을 보여준다. 본 연구에서 사용된 모래밭버섯균은 MMN 배지에서 다른 종에 비해 우수한 생장을 보였으며, 중금속의 내성 효과도 이러한 배지의 효과를 무시할 수 없다고 판단된다.

다. 각 균종별 내성지수

미생물의 중금속 내성은 내적인 특성이나 독성의 환경적인 변화를 통하여 중금속 독성에서 살아남기 위한 능력으로 정의되며(Gadd, 1992), 생존을 결정하는 내적 특성은 불투과성 세포벽, 세포밖 다당류, 대사물질의 유출, 특히 결합이나 침전에 의한 중금속 해독 능력의 소유라고 볼 수 있다(Gadd, 1993).

중금속 처리에 따른 각 균종별 내성지수는 중금속에 따라 다양하게 나타났다(Table 6). Pb 50ppm에서, 황소비단그물버섯균은 내성지수가 103으로 가장 크게 나타났으며, 비단그물버섯도 99의 비교적 큰 내성지수를 나타내었다. 그러나 모래밭버섯균은 58로 낮은 내성지수를 보였다, Pb 200ppm에서는 졸각버섯이 큰 내성지수인 105를 나타냈으며, 모래밭버섯균과 황소비단그물버섯균이 각각 53, 46으로 매우 낮은 내성지수를 나타내었다. Cu 50ppm에서는 비단그물버섯균의 내성지수가 78로 가장 컸으며, 황소비단그물버섯균은 6으로 거의 내성을 나타내지 못하였다. Zn에서는 비단그물버섯이 88의 내성지수로 가장 큰 경향을 보였으며, 모래밭버섯균과 황소비단그물버섯균은 각각 73, 67이었으며, 졸각버섯균은 36으로 매우 낮은 내성을 보였다. Zn 200ppm에서도 모래밭버섯균과 비단그물버섯이 가장 큰 내성지수인 65, 64이었으며, 비단그물버섯과 졸각버섯의 내성지수는 각각 43, 36으로 낮은 경향을 보였다.

Rühling 등(1984)은 졸각버섯이 중금속에 대한 저항성이 비교적 큰 것으로 보고하였고, 중금속 농도가 높은 지역에서 빈도가 증가하는 경향을 보인다고 주장하였으

나, 본 연구에서는 Pb 50ppm을 제외한 모든 중금속 처리구에서 매우 내성이 낮은 것으로 나타났다.

세가지 중금속에 대한 내성의 평균치를 구할 경우, 비단그물버섯의 내성 수치가 가장 높은 84를 보여서 네 균종 중에서 평균 내성이 가장 높은 것으로 보인다.

Table 6. Tolerance indeces of four ectomycorrhizal fungi against Pb, Cu and Zn

Metal / Species	Pb		Cu		Zn		Average
	50ppm	200ppm	50ppm	200ppm	50ppm	200ppm	
Pisolithus tinctorius	58b*	53b	62b	19	73b	65a	55
Laccaria laccata	67b	105a	32c	N.G.	36c	36b	55
Suillus bovinus	103a	46b	6d	N.G.	67b	43b	53
Suillus luteus	99a	91a	78a	N.G.	88a	64a	84

* Means within the same metal with different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$. N.G. indicates non-growth due to gorwth inhibition at 200ppm Cu.

라. 균종별 중금속 축적 농도

균은 고등식물에서 보고된 것보다 더 많은 량의 중금속을 축적한다. 이것은 고등균류의 특이한 해부학적, 생리학적 특성, 즉 균사의 큰 표면적 때문이다. 이 균사는 넓은 지역에 퍼져 있으며, 토양과의 접촉 면적을 증가시킨다(Gadd, 1993).

본 연구에서 중금속 축적 농도는 각 균종별 큰 차이를 보여주었다(Table 7). 모래밭버섯균과 졸각버섯균은 Pb 50ppm에서 가장 높은 1139ppm과 1227ppm의 농도를 보여 주었다. 평균 Pb 함량은 균에서 일반적으로 낮게 나타나며, 자실체에서의 Pb 함량은 종 특이성이 적어 종간 균일하게 분포되어 있는 것으로 알려졌으나(Markert, 1993), 본 연구에서 나타난 균사내의 Pb 축적은 종간 차이가 큰 것으로 나타났다. 특히 모래밭버섯균과 졸각버섯은 다른 두 종보다 2배이상 축적을 보였다. 그러나 Pb

200ppm에서는 모래밭버섯균과 졸각버섯균은 축적이 감소된 반면 황소비단그물버섯균과 비단그물버섯균은 오히려 축적인 증가되어 종간 차이가 있음을 나타내었다.

Cu의 경우, 황소비단그물버섯균과 비단그물버섯균은 1355ppm과 2546ppm이 각각 축적되어 비교적 높은 농도로 Cu를 축적하는 것으로 나타났으나, 모래밭버섯균과 졸각버섯균은 매우 낮은 축적을 보였다.

Zn는 균에서 필수적인 양료로 Pb와 같은 비필수 요소와는 달리 Zn 농도의 변이는 대부분의 종에서 적게 나타난다. 80종의 균에서 Zn 농도가 50-300mg/kg였다고 보고했으며, 균의 Zn 농도는 토양 농도와 독립적으로 나타나는데, 이것은 Zn의 흡수에 대한 조절 기작이 있는 것으로 보인다(Markert, 1993).

황소비단그물버섯균과 비단그물버섯균은 Zn 200ppm에서 2070ppm과 2118ppm을 축적하고 있는 것으로 나타났으며, 모래밭버섯균가 졸각버섯균은 매우 낮은 축적으로 보였다. Zn 50ppm에서는 황소비단그물버섯균이 1316ppm으로 4종 균 중 가장 높은 농도를 나타내었으며, 졸각버섯균은 가장 낮은 농도를 보였다.

Table 7. Pb, Cu, and Zn concentrations(average±sd) in fungal mycelium of four ectomycorrhizal fungi

(단위:ppm)

Metal / Species	Pb		Cu		Zn	
	50	200	50	200	50	200
Pisolithus tinctorius	1139.3±19.1b*	72.3±12.6d	177.0±12.0d	N.M.	615.3±175.5b	396.3±4.5d
Laccaria laccata	1227.3±7.4a	721.7±19.4b	303.3±9.7c	N.M.	110.0±1.7c	595.3±2.5c
Suillus bovinus	532.0±10.1d	615.3±20.8c	1355.0±12.2b	N.M.	1316.6±14.6a	2070.3±21.2b
Suillus luteus	888.7±32.6c	1014.6±29.8a	2546.0±11.5a	N.M.	503.3±2.5b	2118.0±21.7a

* Means within the same metal with different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$. N.M. indicates no mesurement due to growth inhibition of

the fungi.

본 연구에 사용된 4종 균근 중 황소비단그물버섯균과 비단그물버섯균은 Zn와 Cu에 대해 높은 축적을 보이며, 모래밭버섯균과 졸각버섯은 낮은 Pb 농도에 대해 높은 축적을 보였다. 즉, 중금속에 따라 종간 축적 특성으로 크게 달라지며, 중금속의 농도에 따라 축적 특성이 변화된다고 볼 수 있다.

3. 균근균이 접종된 포플러 4종의 중금속 흡수 능력

가. 포플러 4종의 Cd 흡수 특성

1) Cd 처리 농도에 따른 수종별 차이

Cd이 처리된 포플러 4종의 부위별 Cd 농도는 Table 8과 같이 큰 차이를 보여 주었으며, Cd의 처리 농도가 증가함에 따라 식물 체내에 축적되는 농도는 증가하였다.

현사시나무의 경우는 잎에서 가장 높은 농도의 중금속을 축적하는 것으로 나타났다. 특히 Cd 80ppm이 처리된 현사시나무의 잎에서는 Cd 농도가 평균 3,245ppm로 매우 높았다. 또한 줄기와 뿌리에서도 처리된 Cd 농도보다 높은 농도를 보여 주었으며, 뿌리에서는 Cd 30ppm과 Cd 80ppm의 처리구에서 거의 유사한 농도를 나타내었고, 각각의 농도는 477.6ppm과 521.8ppm이었다. 이태리포플러는 뿌리에서 가장 높은 농도를 나타내었으며, Cd 80ppm 처리구의 뿌리내 Cd 농도는 424.9ppm으로 잎과 줄기의 농도보다 8배에서 10배 정도 높은 값을 보였다. 양황철의 Cd 처리에 따른 부위별 중금속 농도는 뿌리에서 가장 높았으며, 처리 농도가 증가함에 따라 부위별 중금속 농도도 증가하였다. 특히 뿌리에서 높은 농도를 보여 주었으며, Cd 30ppm과 Cd 80ppm 처리구의 Cd 농도는 192.3ppm, 568.7ppm이었다.

수원포플러의 Cd 농도는 Cd 80ppm이 처리된 뿌리에서 가장 높은 453.1ppm을 나타내었고, Cd 30ppm 처리구의 줄기에서는 20.6ppm으로 매우 낮았다. 줄기에서는 Cd 처리 농도가 30ppm에서 80ppm으로 증가함에 따라 축적 농도는 2배 정도 증가하였으나, 처리 농도보다 낮은 농도였으며, Cd 30ppm과 Cd 80ppm에 처리된 줄기에서의

Cd 농도는 각각 20.6ppm과 48.9 ppm이었다. 그러나 잎과 뿌리에서는 모두 처리된 농도보다 높은 농도로 축적되었다.

Table 8. Tissue concentrations and content of Cd in four *Populus* species treated with 0(control), 30 or 80 ppm of Cd in soil.

Species	Cd concentration added (ppm)	Cd concentration (ppm)			Cd content per seedling (μg/sedling)			
		Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root	Total
Populus alba×glandulosa	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	702.0	62.0	477.6	1614.6	260.4	1528.3	3403.3
	80	3245.0	131.5	521.8	8436	591.8	1617.6	10645.4
Populus euramericana	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	21.3	21.6	170.9	38.3	84.2	598.2	720.7
	80	67.7	57.5	424.9	121.9	258.8	1827.1	2207.8
Populus nigra×maximiwiczii	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	21.3	35.4	192.3	38.3	138.1	884.6	1061.0
	80	115.0	88.0	568.7	253.0	334.4	2957.2	3544.6
Populus koreana×nigra var. italica	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	37.5	20.6	176.9	75.0	74.2	583.8	733.0
	80	150.8	48.9	453.1	301.6	166.3	1495.2	1963.1

Cd 처리된 포플러 4종 중 가장 많은 량의 Cd 흡수량을 나타낸 것은 현사시나무로 Cd 80ppm이 처리된 나무에서는 개체 당 평균 10,645μg을 흡수하였다. 가장 낮은 흡수 능력을 가진 것은 수원포플러로 Cd 80ppm을 처리한 나무의 평균 흡수량은 개체 당 1,963.1μg이었다.

2) 포플러의 균근균 접종에 따른 Cd 흡수 능력

포플러 4종의 균근균 접종에 따른 Cd 흡수 능력은 Table 9와 같이 나타내었다. 균근균이 접종된 현사시나무의 중금속 축적에 대한 특성은 부위별로 다르게 나타났다. 잎에서는 균근균이 접종된 처리구에서 Cd 농도가 1417.1ppm으로 균근균이 접종

되지 않은 처리구보의 838.3ppm으로 2배를 보여 주었다. 그러나 줄기에서는 균근균의 접종 여부에 따라 큰 차이를 보여 주지 않았으며, 뿌리에서도 큰 차이를 보여 주지 않았으나, 균근균이 접종되지 않은 처리구에서 306.1ppm으로 다소 높은 경향을 보였다. 그러나 개체 당 흡수량은 균이 접종된 나무에서 총 5053.6μg으로 균이 접종되지 않은 나무의 3060.3μg보다 많았다.

이태리포플러는 뿌리에서 가장 높은 농도를 나타내었으나 균 접종에 따른 중금속의 축적 농도는 크게 나타나지 않았다. 그러나 줄기에서는 균 접종구에서 다소 높은 경향을 나타내었고, 잎과 뿌리에서는 비 접종구에서 높은 경향을 보였다. 이태리포플러의 개체 당 총 Cd 흡수량은 균 접종에 따른 차이를 보여 주지 않았다.

양황철은 잎과 줄기에서는 큰 차이를 보여 주지 않았으나, 뿌리에서는 비접종 처리구보다 2배 정도로 높은 농도를 나타내었다. 총 흡수량은 균 접종구가 1722.9μg으로 비 접종구보다 높았으며, 특히 뿌리에서의 축적량이 매우 높게 나타났다.

수원포플러는 줄기와 뿌리에서 균 접종구가 비 접종구보다 높은 농도를 보여 주었으나, 잎에서는 비 접종구가 58.7ppm으로 접종구의 39.8ppm 보다 높은 농도를 나타내었다. 그러나 총 흡수량은 1015.1μg으로 비 접종구보다 많은 량을 흡수하였다.

Table 9. Tissue concentrations and content of Cd in mycorrhizal(EM) and non-mycorrhizal(NON) seedlings of four *Populus* species exposed to 0(control), 30 or 80 ppm of Cd in soil.

Species	Mycorrhizal associate	Cd concentration (ppm)			Cd content per seedling (μg/seedling)			
		Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root	Total
Populus	EM	1417.1	56.0	289.4	3967.9	246.4	839.3	5053.6
alba×glandulosa	NON	838.3	55.0	306.1	1844.3	236.5	979.5	3060.3
Populus	EM	19.48	31.9	187.9	31.2	134.0	638.9	804.1
euramericana	NON	39.82	20.8	209.3	59.7	89.4	816.3	965.4
Populus	EM	42.4	45.1	320.7	76.3	171.4	1475.2	1722.9
nigra×maximiwiczii	NON	48.5	37.2	186.6	92.2	141.4	877.0	1110.6
Populus	EM	39.8	26.9	224.9	63.7	96.8	854.6	1015.1
koreana×nigra var. italica	NON	58.7	19.4	195.2	129.1	66.0	566.1	761.2

나. 포플러 4종의 Pb 흡수 특성

1) Pb 처리 농도에 따른 수종별 차이

Pb로 처리된 현사시나무는 Table 10에서 보는 바와 같이 처리 농도별, 부위별 특성이 다르게 나타났다. 잎에서는 Pb의 처리 농도에 따라 큰 차이를 보여주지 않았으나, 줄기에서는 Pb 300ppm이 처리된 나무에서 159.4ppm으로 조사부위 중 가장 높은 농도를 보여 주었다. Pb 300ppm이 처리된 현사시나무의 개체 당 Pb 흡수량은 1,210 μg으로 4종 포플러 중 가장 낮은 량을 흡수하였다.

Table 10. Tissue concentrations and content of Pb in four *Populus* species treated with 0(control), 50 or 300 ppm of Pb in soil.

Species	Pb concentration added (ppm)	Pb concentration (ppm)			Pb content per seedling (μg/seedling)			
		Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root	Total
Populus alba×glandulosa	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	59.2	77.8	79.8	153.9	365.7	255.4	775.0
	300	68.0	159.4	87.8	183.6	781.1	245.8	1210.5
Populus euramericana	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	92.8	50.2	1470.5	176.3	241.0	5146.8	5564.1
	300	547.7	425.0	2237.9	1040.6	2082.5	9623.0	12746.1
Populus nigra×maximiwiczii	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	114.5	31.6	589.6	251.9	132.7	2889.0	3273.6
	300	914.8	427.4	1300.8	2287.0	1666.9	5723.5	9677.4
Populus koreana×nigra var. italica	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	347.9	38.0	630.3	1043.7	155.8	2143.0	3342.5
	300	983.0	260.0	1106.5	2162.6	910.0	3651.5	6724.1

Pb가 처리된 이태리포플러는 뿌리에서 가장 높은 농도를 나타내었으며, 처리 농도가 증가함에 따라 축적 농도도 증가하였다. 또한 모든 부위에서 처리 농도보다 높

은 농도를 나타내었으며, 특히 뿌리에서는 처리 농도의 7배에서 30배의 농도를 나타내었고, Pb 50ppm, Pb 300ppm 처리구에서의 각각의 농도는 1470.5ppm, 2237.9ppm 이었다. Pb 300ppm이 처리된 이태리포플러의 개체 당 Pb 흡수량은 12,746㎍으로 4종 포플러 중 가장 많은 량을 흡수하였다.

Pb 처리된 양황철의 뿌리는 매우 높은 농도의 Pb를 축적하는 것으로 나타났다. 특히 Pb 300ppm을 처리한 나무의 뿌리는 1300.8ppm으로 높은 농도를 나타내었다. 또한 Pb 300ppm을 처리한 나무의 잎에서도 914.8ppm의 높은 농도를 보였다. Pb 300ppm이 처리된 양황철의 개체 당 흡수량은 9677.4㎍이었다.

수원포플러의 Pb 처리 농도에 따른 부위별 축적 농도는 큰 차이를 나타내었고, 처리 농도가 증가함에 따라 축적 농도도 증가하였다. 잎에서는 처리 농도의 3배에서 6배의 높은 농도를 나타내었고, Pb 300ppm이 처리된 나무의 뿌리에서 가장 높은 농도인 1106.5ppm을 나타내었다. Pb 300ppm이 처리된 나무의 개체 당 흡수량은 6,724.1㎍이었다.

2) 포플러의 균 접종에 따른 Pb 흡수 능력

현사시나무의 균근균 접종에 따른 Pb 흡수 효과는 줄기에서 뚜렷하게 나타났다 (Table 11). 그러나 균근균이 접종되지 않은 처리구의 줄기에서 105ppm으로 가장 높은 Pb 농도를 나타내었으며, 잎과 뿌리에서는 큰 효과를 나타내지 않았다.

이태리포플러에서도 균이 접종되지 않은 처리구에서 균 접종구보다 높은 경향을 보였고, 줄기를 제외한 잎과 뿌리에서는 중금속 농도에 큰 차이를 보여 주지 않았다.

양황철의 잎과 줄기에서는 비 접종구보다 접종구가 높은 농도를 나타났으며, 뿌리에서는 큰 차이를 보여 주지 않았다. 특히 잎과 줄기에서는 비 접종구보다 2배에서 2.5배의 높은 농도를 보였다.

수원포플러의 균 접종구는 잎에서 비접종구의 381.2ppm 보다 1.5배 정도 높은 농도를 나타내었고, 뿌리에서도 비 접종구보다 2배 정도 높은 734.5ppm을 나타내었다. 그러나 줄기에서는 큰 차이를 보여 주지 않았다.

Table 11. Tissue concentrations and content of Pb in mycorrhizal(EM) and non-mycorrhizal(NON) seedlings of four *Populus* species treated with 0(control), 50 or 300 ppm of Pb in soil.

Species	Mycorrhizal associate	Pb concentration (ppm)			Pb content per seedlings (μg/seedling)			
		Leaf	Stem	root	Leaf	Stem	Root	Total
Populus	EM	48.1	46.3	59.8	144.3	222.2	173.4	539.9
alba×glandulosa	NON	36.7	105.3	52.0	80.7	484.4	150.0	715.1
Populus	EM	202.9	96.0	1250.3	344.9	412.8	4251.0	5008.7
euramericana	NON	224.1	220.7	1221.9	358.6	1081.4	4765.4	6205.4
Populus	EM	501.1	208.4	567.3	952.1	812.8	2496.1	4261.0
nigra×maximiwiczii	NON	185.1	97.7	692.9	425.7	381.0	3256.6	4063.3
Populus	EM	506.0	93.3	734.5	1062.6	345.2	3011.5	4419.3
koreana×nigra var. italica	NON	381.2	105.4	423.3	953.0	389.9	1142.9	2485.8

4. 균근균이 접종된 포플러 4종의 중금속 처리에 따른 생리적 특성 변화

가. 포플러 4종의 생장량 비교

1) Cd과 Pb 처리 농도에 따른 수종별 생장량 차이

Cd가 처리된 현사시나무의 생장량은 처리 농도에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 12). 그러나 뿌리에서는 Cd 처리구가 대조구보다 더 큰 생장량을 보였다. 또한 T/R률은 Cd 처리구가 비 처리구보다 낮은 경향을 보였다. 이태리포플러의 Cd 처리별 생장량의 변화는 잎과 뿌리에서 차이를 나타내었다. 특히 Cd 80ppm이 처리된 나무의 잎과 뿌리 건중량은 대조구보다 크게 나타났다. TR률은 처리 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보여 주었다. 양황철의 Cd 처리에 따른 생장량 변화는 잎에서 나타났다. 잎에서는 처리 농도가 증가함에 따라 생장량이 증가하는 경향을 보여 주었으며, 줄기와 뿌리에서도 대조구 보다 Cd 처리구가 다소 높은 생장량을 나타내었다. 수원포플러의 Cd 처리별 생장량은 변화를 보이지 않았다. 그러나 줄기와 뿌리에서 처리에 따라 다소 감소하는 경향을 보여 주었다.

Pb가 처리된 현사시나무는 생장량은 처리 농도에 따라 큰 차이가 없었다(Table 13). 그러나 이태리포플러는 잎과 뿌리에서 Pb 처리에 따른 차이를 나타내었다. 이태리포플러의 잎과 뿌리 건중량은 Pb가 처리구에서 대조구보다 높은 경향을 나타내었으며, 줄기에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 양황철은 Pb 처리구의 잎에서 대조구보다 높은 생장량을 나타내었으며, 줄기와 뿌리에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 수원포플러의 잎에서는 Pb 처리에 따른 건중량 차이가 나타났으나, 줄기와 뿌리에서는 큰 차이 보이지 않았다. 수원포플러의 잎에서는 처리구에서 높은 건중량을 나타내었으며, TR률은 Pb 처리구에서 높았고, 특히 Pb 50ppm의 처리구에서 가장 높은 TR률을 나타내었다.

Table 12. Effects of Cd treatments in soil on leaf, stem, root, and total dry weight of four *Populus* species

Species	Cd concentration added (ppm)	Dry weight(g)				
		Leaf	Stem	Root	Total	Trunk/Root
Populus alba×glandulosa	0	2.5±0.7	4.5±0.8	2.8±0.48b	9.8±1.3	2.7±0.81a
	30	2.3±0.6	4.2±0.8	3.2±0.57a	9.7±1.1	2.1±0.38b
	80	2.6±0.7	4.5±1.0	3.1±0.32ab	10.2±1.3	2.3±0.53ab
Populus euramericana	0	1.0±0.4b	4.2±1.3	3.2±0.66b	8.4±1.8	1.7±0.55
	30	1.8±0.7a	3.9±0.9	3.5±0.77b	9.2±1.3	1.6±0.33
	80	1.8±0.4a	4.5±0.6	4.3±0.85a	10.6±0.8	1.5±0.48
Populus nigra×maximiwiczii	0	1.5±0.5b	3.6±1.3	4.2±1.48	9.3±1.8	1.3±0.41
	30	1.8±0.7ab	3.9±1.3	4.6±1.46	10.3±2.0	1.3±0.36
	80	2.2±0.4a	3.8±0.6	5.2±0.52	11.2±0.9	1.2±0.20
Populus koreana×nigra var. italica	0	1.7±0.9	3.6±0.6	3.5±1.04	8.8±1.5	1.7±0.77
	30	2.0±1.0	3.6±0.6	3.3±1.11	8.9±2.1	1.7±0.44
	80	2.0±0.9	3.4±0.8	3.3±1.02	8.7±1.5	1.9±1.06

* Means with the same letter are not significantly different at 5% level in Duncan's multiple range test

Table 13. Effects of Pb treatments in soil on leaf, stem, root, and total dry weight of four *Populus* species.

Species	Pb concentration added (ppm)	Dry weight(g)				
		Leaf	Stem	Root	Total	Trunk/Root
Populus alba×glandulosa	0	2.6±0.7	4.5±0.8	2.8±0.4	9.9±1.3	2.7±0.81
	50	2.6±0.9	4.7±1.0	3.2±0.7	10.5±1.8	2.3±0.66
	300	2.7±0.8	4.9±0.7	2.8±0.7	10.4±1.0	2.9±0.76
Populus euramericana	0	1.0±0.4b	4.3±0.6	3.2±0.8b	8.5±0.8b	1.7±0.48
	50	1.9±0.3a	4.8±1.1	3.5±0.4ab	10.2±1.3a	1.9±0.49
	300	1.9±0.5a	4.9±0.8	4.3±1.2a	11.1±1.2a	1.7±0.39
Populus nigra×maximiwiczii	0	1.5±0.5b	3.7±1.3	4.2±1.4	9.4±1.4	1.3±0.41
	50	2.2±0.8b	4.2±1.0	4.9±0.7	11.3±1.6	1.3±0.4
	300	2.5±0.1a	3.9±0.6	4.4±0.8	10.8±0.7	1.5±0.27
Populus koreana×nigra var. italica	0	1.7±0.9b	3.6±0.6	3.5±1.0	8.8±1.6b	1.7±0.77b
	50	3.0±1.1a	4.1±1.8	3.4±1.8	10.5±2.8a	2.4±1.11a
	300	2.2±0.8b	3.5±0.7	3.3±0.9	9.0±1.2b	1.8±0.65b

* Means with the same letter are not significantly different at 5% level in Duncan's multiple range test.

2) **균근균 접종 포플러의 수종별 생장량 차이**

Table 14**에서 보는 바와 같이** Cd**가 처리된 현사시나무의 잎에서는 균근균의 비 접종구가 접종구보다 다소 높은 건중량을 나타내었으며,** TR**률도 비 접종구보다 접종구가 작았다. 이태리포플러는 균근균 접종에 의해 뿌리의 건중량이 증가되는 경향을 보였으며,** TR**률은 접종구가 비 접종구에 비해 감소하였다. 양황철의 균근균 접종 효과는 나타나지 않았으나, 잎과 뿌리에서 접종구가 다소 높은 경향을 보였다. 수원 포플러의 균근균 접종에 따른 효과는 잎과 뿌리에서 나타났으며, 잎에서는 접종구가 비 접종구의 건중량보다 높았으며. 뿌리는 오히려 반대의 경향을 보여 주었다.** TR**률**

은 접종구에서 비접종구보다 높았다.

Pb가 처리된 현사시나무는 균근균 접종구에서 비접종구보다 잎의 건중량이 적었으며, TR률이 감소하는 경향을 보였다(Table 15). 이태리포플러의 줄기에서는 균 접종에 따라 생장량이 증가하는 것으로 나타났으며, 잎과 뿌리는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 뿌리의 건중량은 균근균 접종구에서 약간 증가하는 경향을 나타내었고, TR률은 큰 차이가 없었다. 양황철의 균근균 접종구의 효과는 잎에서 나타났으며, 균 접종구의 잎 건중량이 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 줄기에서는 큰 차이가 없었으며, 다만 균인 접종된 나무의 뿌리 건중량은 증가하는 경향을 보였다. 수원포플러의 경우는 균 접종구의 뿌리 건중량이 비 접종구의 건중량보다 크게 감소하였다. 그러나 잎과 줄기의 건중량은 큰 차이가 없었고, TR률은 균 접종구에서 높았다.

Table 14. Effects of mycorrhizal associate on leaf, stem, root and total dry weight of four *Populus* species treated with 0, 30 or 80 ppm of Cd in soil.

Species	Mycorrhizal associate	Dry weight(g)				
		Leaf	Stem	Root	Total	Trunk/Root
Populus alba×glandulosa	NON	2.8±0.5a	4.4±0.8	2.9±0.4	10.1±1.2	2.6±0.7a
	EM	2.2±0.6b	4.3±0.9	3.2±0.5	9.7±1.2	2.1±0.4b
Populus euramericana	NON	1.6±0.7	4.2±0.7	3.4±0.9b	9.2±1.1	1.8±0.4a
	EM	1.5±0.6	4.3±1.2	3.9±0.6a	9.7±1.7	1.5±0.3b
Populus nigra×maximiwiczii	NON	1.8±0.6	3.8±1.0	4.6±1.3	10.2±1.4	1.3±0.3
	EM	1.9±0.6	3.8±1.1	4.7±1.1	10.4±1.6	1.3±0.3
Populus koreana×nigra var. italica	NON	1.6±0.8b	3.6±1.2	3.8±1.0a	9.0±1.9	1.4±0.4b
	EM	2.2±0.9a	3.4±0.9	2.9±0.8b	8.5±1.5	2.1±0.8a

* Means with the same letter are not significantly different at 5% level in Duncan's multiple range test. NON and EM represent mycorrhizal and

non-mycorrhizal seedlings, respectively

Table 15. Effects of mycorrhizal associate on leaf, stem, root and total dry weight of four *Populus* species treated with 0, 50 or 300 ppm of Pb in soil

Species	Mycorrhizal associate	Dry weight(g)				
		Leaf	Stem	Root	Total	Trunk/Root
Populus alba×glandulosa	NON	3.0±0.5a	4.8±0.9	2.9±0.6	10.7±1.2a	2.8±0.72
	EM	2.2±0.7b	4.6±0.8	2.9±0.6	9.7±1.5b	2.5±0.79
Populus euramericana	NON	1.7±0.6	4.3±0.6b	3.4±0.7	9.4±1.1	1.7±0.40
	EM	1.6±0.6	4.9±1.0a	3.9±1.1	10.4±1.5	1.7±0.52
Populus nigra×maximiwiczii	NON	1.9±0.6b	3.9±0.8	4.4±0.7	10.2±1.1	1.4±0.34
	EM	2.3±0.7a	3.9±1.1	4.7±1.2	10.9±1.6	1.4±0.39
Populus koreana×nigra var. italica	NON	2.1±1.2	3.7±1.5	4.1±1.4a	9.9±2.6	1.5±0.56b
	EM	2.5±1.0	3.7±0.7	2.7±0.6b	8.9±1.4	2.5±0.93a

* Means with the same letter are not significantly different at 5% level in Duncan's multiple range test. NON and EM represent mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings, respectively

나. 중금속 및 균 접종에 따른 광합성, 기공전도도 및 증산량의 변화

1) Cd과 Pb 처리 농도에 따른 효과

Table 16에서 보는 바와 같이 Cd가 처리된 현사시나무는 Cd 처리 농도에 따라 차이를 보였다. 광합성은 Cd 30ppm을 처리했을 때 가장 낮은 경향을 보였으며, Cd 80ppm 처리구에서 가장 높은 값인 16.8μmolCO2/m2/s을 보여 주었다. 기공전도도는 광합성과는 반대로 Cd 30ppm 처리구에서 가장 높은 값인 0.76molH2O/m2/s을 나타내었고, 증산량은 Cd 80ppm 처리구에서 가장 높은 값인 4.87mmolH2O/m2/s을 나타내었고, Cd 30ppm 처리구에서 가장 낮은 값인 3.67mmolH2O/m2/s을 나타내었다. Cd 처리된 수원포플러의 광합성은 Cd 80ppm 처리구에서 가장 높은 14.75μmolCO2/m2/s를 나타내었으며, 기공전도도는 Cd 처리에 따른 차이를 보이지 않았으

나 처리 농도가 증가함에 따라 다소 증가하는 경향을 보였다. 증산량은 Cd 처리구가 대조구보다 높은 경향을 나타내었다.

Pb가 처리된 현사시나무의 광합성은 Pb 50ppm 처리구에서 가장 높은 값인 15.78 μmolCO2/m2/s을 나타내었으며, Pb 300ppm 처리구에서 가장 낮은 값인 13.4 μmolCO2/m2/s를 나타내었다. 기공전도도는 Pb 50ppm 처리구에서 가장 높은 값인 0.45molH2O/m2/s를 나타내었고, Pb 300ppm 처리구에서 가장 낮은 값인 0.28molH2O/m2/s을 나타내었다. 증산량은 처리별 차이를 보여 주었으며, Pb 50ppm 처리구에서 가장 높은 4.89mmolH2O/m2/s를 나타내었고, Pb 300ppm 처리구에서 가장 낮은 3.72mmolH2O/m2/s를 나타내었다.

Pb가 처리된 수원포플러의 광합성은 처리구에서 대조구보다 높은 값을 보여 주었으며, 기공전도도도 처리구에서 높은 값을 나타내었다. 또한 증산량도 대조구보다 높은 값을 나타내었다.

Table 16. Effects of Cd and Pb treatments in soil on photosynthesis, stomatal conductance, and transpiration of two *Populus* species.

Species	Metal concentration added (ppm)	Photosynthesis (μmolCO2/m2/s)	Stomatal conductance (molH2O/m2/s)	Transpiration rate (mmolH2O/m2/s)
Populus alba×glandulosa	0	14.3±0.98	0.33±0.015	4.01±0.125
	Cd 30	10.5±1.52	0.76±1.230	3.67±0.543
	Cd 80	16.8±1.64	0.44±0.073	4.87±0.438
	Pb 50	13.4±2.00	0.45±0.019	4.89±0.115
	Pb 300		0.28±0.039	3.72±0.273
Populus koreana×nigra var. italica	0	13.5±0.59	0.30±0.029	3.79±0.250
	Cd 30	12.7±1.44	0.32±0.051	4.20±0.430
	Cd 80	14.7±2.25	0.33±0.043	4.28±0.224
	Pb 50	16.1±0.33	0.43±0.069	4.71±0.306
	Pb 300	16.6±1.05	0.37±0.026	4.48±0.206

Cd는 광합성을 효과적으로 저해하는 요인인데, 식물에 Cd를 처리하면 기공이 닫히기 때문에 순 광합성이 감소하고, 증산이 저해된다(Huang 등, 1974). Cd가 처리된 식물에서 기공 저항은 증가하며, 식물의 기공이 열리는 것을 저해하는 것은 Cd의 농도와 노출 시간, 식물의 독성 정도에 따라 좌우된다(Shoeran 등, 1990).

2) 균근균 접종에 따른 효과

균근균이 접종된 현사시나무의 광합성은 큰 차이를 보여 주지 않았으나(Table 17), 균근균 접종구에서 다소 높은 경향을 보였고, 기공전도도도 접종구에서 다소 높았다. 그러나 증산량은 차이를 전혀 보이지 않았다. 수원포플러의 균근균 접종구는 비 접종구보다 광합성이 증가하는 것으로 나타났으며, 기공전도도도 비접종구의 0.30molH2O/m2/s보다 높은 0.34molH2O/m2/s를 나타내었다. 또한 증산량도 접종구에서 높은 값인 4.19를 나타내었다.

Table 17. Effects of mycorrhizal associate on photosynthesis, stomatal conductance, and transpiration of two *Populus* species treated with Cd and Pb in soil

Species	Metal species	Mycorrhizal associate	Photosynthesis (μmolCO2/m2/s)	Stomatal conductance (molH2O/m2/s)	Transpiration rate (mmolH2O/m2/s)
Populus alba×glandulosa	Cd	NON	13.7±3.90	0.35±0.132	4.12±0.91
		EM	14.0±1.79	0.67±0.972	4.24±0.17
		NON	15.2±1.84a	0.34±0.077	4.14±0.53
		EM	13.8±1.52b	0.36±0.085	4.26±0.56
Populus koreana×nigra var. italica	Pb	NON	13.0±1.25b	0.30±0.042b	3.99±0.42
		EM	14.4±1.89a	0.34±0.036a	4.19±0.30
		NON	15.0±1.52	0.32±0.049b	4.07±0.41b
		EM	15.7±1.65	0.39±0.069a	4.51±0.43a

* Means with the same letter are not significantly different at 5% level in Duncan's multiple range test.

Pb가 처리된 현사시나무의 균근균 접종구는 비접종구보다 광합성량이 낮은 경향을 보였으며, 기공전도도와 증산량은 큰 차이가 보이지 않았다. 수원포플러의 균근균 접종구의 광합성은 큰 차이가 없었으며, 기공전도도는 접종구가 다소 높았고, 증산량은 또한 접종구에서 높은 경향을 보였다.

다. 광색소 함량 변화

전형적인 Cd 독성 증상은 잎의 괴사된 반점을 가진 황화 현상과 황갈색 변색, 그리고 두껍고 손상된 뿌리 등으로 나타난다(Adriano, 1986). 이러한 증상은 엽록소 함량의 감소로 나타나며, 중금속의 농도와는 부의 상관을 보여준다(Simon 등, 1996)

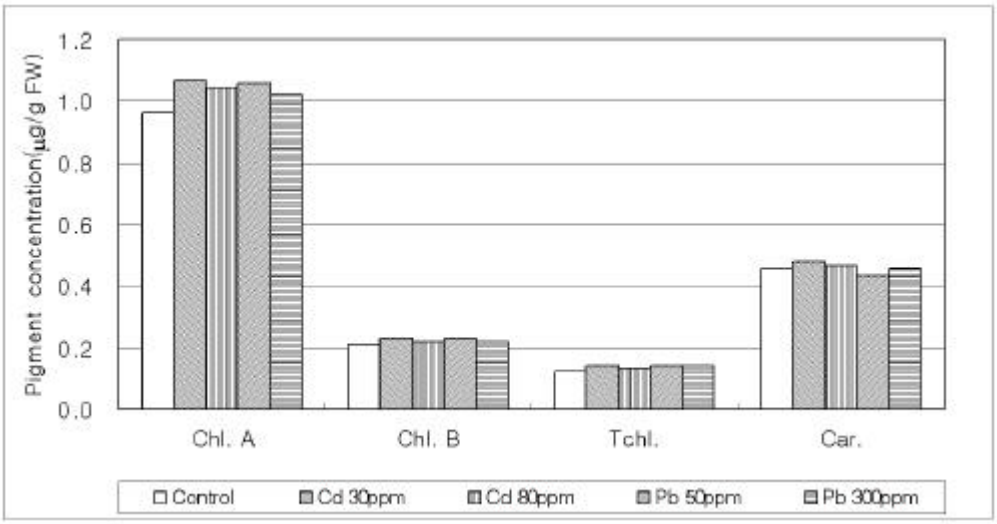


Figure 7. Effects of Cd and Pb treatment in soil on photosynthetic pigments in leaves of *Populus alba×glandulosa*. Chl. A = chlorophyll a, Chl. B= chlorophyll b, Tchl.= total chlorophyll, Car.= total carotenoids

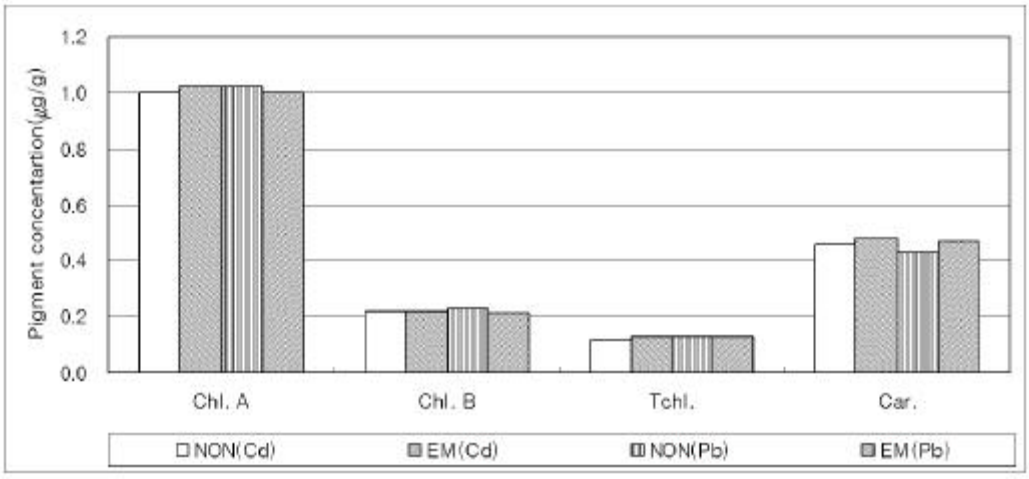


Figure 8. Effects of mycorrhizal associate on photosynthetic pigments in leaves of *Populus alba×glandulosa* treated with Cd and Pb in soil. Chl. A = chlorophyll a, Chl. B= chlorophyll b, Tchl.= total chlorophyll, Car.= total carotenoids. NON(Cd)=non-mycorrhizal seedlings treated with Cd in soil, EM(Cd)=mycorrhizal seedlings treated with Cd in soil, NON(Pb)=non-mycorrhizal seedlings treated with Pb in soil, EM(Pb)=mycorrhizal seedlings treated with Pb in soil.

본 연구에서는 Cd 처리 농도에 따른 현사시나무의 엽록소 함량이 큰 차이를 보이지 않았으며(Figure 7), **Pb 처리된 현사시나무의 엽록소 함량은 Pb 처리구에서 대조구보다 높은 경향을 나타내었다. 또한 Cd와 Pb가 처리된 균근균 접종구에서도 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 처리된 Cd와 Pb에 의한 현사시나무의 피해가 가시적으로 나타나지 않았음을 보여준다. 그러나 일반적으로 중금속에 의해 심하게 오염된 식물은 *in vivo* 상태에서 중금속에 의해 엽록소의 중심 원자인 Mg의 치환이 일어나며, 엽록소를 파괴시켜 광합성을 저해하는 결과를 가져온다**(Kupper, 1996).

Cd는 광합성의 기능을 저해하기 전에 총 엽록소 함량, 엽록소 a/b 비율을 감소시

키며, 일반적으로 카로테노이드는 엽록소보다 중금속에 의해 덜 영향을 받기 때문에 엽록소/카로테노이드의 비가 낮아진다(Krupa, 1988).

라. 뿌리의 acid phosphatase(AP) 활성 변화

1) 중금속 처리에 따른 효과

Acid phosphatase는 다양한 phosphate ester를 가수분해하여 인산 이온을 방출하는 능력을 가지고 있으며, 이들의 활성은 Cd, Pb와 같은 중금속에 의해 저해되는 경향이 있다(Vallee와 Ulmer, 1972).

Cd가 처리된 포플러 4종의 뿌리에서 측정된 acid phosphatse(AP)의 활성은 수종에 따라 큰 차이를 보여 주었다(Figure 9). 특히 현사시나무와 이태리포플러에서 가장 높은 값인 0.8mM/g를 나타내었고, 수원포플러에서 가장 낮은 값을 보여 주었다. 그러나 각 수종의 Cd 처리별 농도에 따른 AP 활성 차이는 나타나지 않았으나, 수원포플러는 Cd 30ppm에서의 AP 활성이 감소하는 경향을 보여 주었다.

Pb가 처리된 포플러 4종의 AP 활성은 수종별로 다양하였으며, 현사시나무에서 가장 높은 활성을 보였고, 수원포플러에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. Pb 처리 농도에 따른 차이는 크지 않았으나, 현사시나무의 경우 Pb 처리구에서 대조구보다 높은 농도를 나타내었다. 또한 이태리포플러와 수원포플러에서는 Pb 300ppm에서 AP의 활성이 감소하는 경향을 보여 주었다.

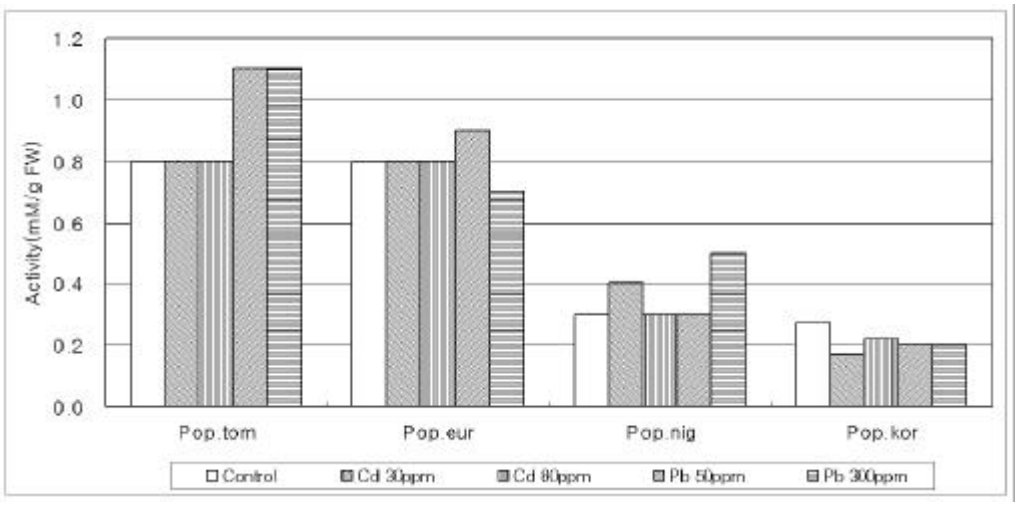


Figure 9. Effects of Cd and Pb treatment in soil on acid phosphatase activity in roots of four *Populus* species. Pop.tom=*Populus alba*×*glandulosa*, Pop.eur=*Populus euramericana*, Pop. nig=*Populus nigra*×*maximiwiczii*, Pop.kor=*Populus koreana*×*nigra var. italica*

2) **균근균 접종에 따른 효과**

균근균을 접종한 포플러의 Cd **처리에 따른** AP **활성의 변화는** Figure 10**에서 보는 바와 같이 현사시나무와 이태리포플러에서 나타났다. 현사시나무와 이태리포플러의** AP **활성은 균 접종구에서 비 접종구보다 높은 값을 보여 주었다.**

균근균을 접종한 포플러의 Pb **처리에 따른** AP **활성은** 4**종 포플러 모두 큰 차이를 나타내지 않았으나, 현사시나무는 비 접종구에서 다소 높은 활성을 나타내었고, 이태리포플러, 양황철, 수원포플러는 접종구에서 다소 높은 경향을 나타내었다.**

균근균의 균사는 Cd**와 같은 중금속에 노출되면 효소 활성이 증가하는 경향을 보여주며, 특히 세포벽의 표면에서 활성이 증가하는데 이와 같은 활성의 증가는 중금속에 대한 내성 기작의 하나이다**(Turnau**와** Dexheimer, 1995).

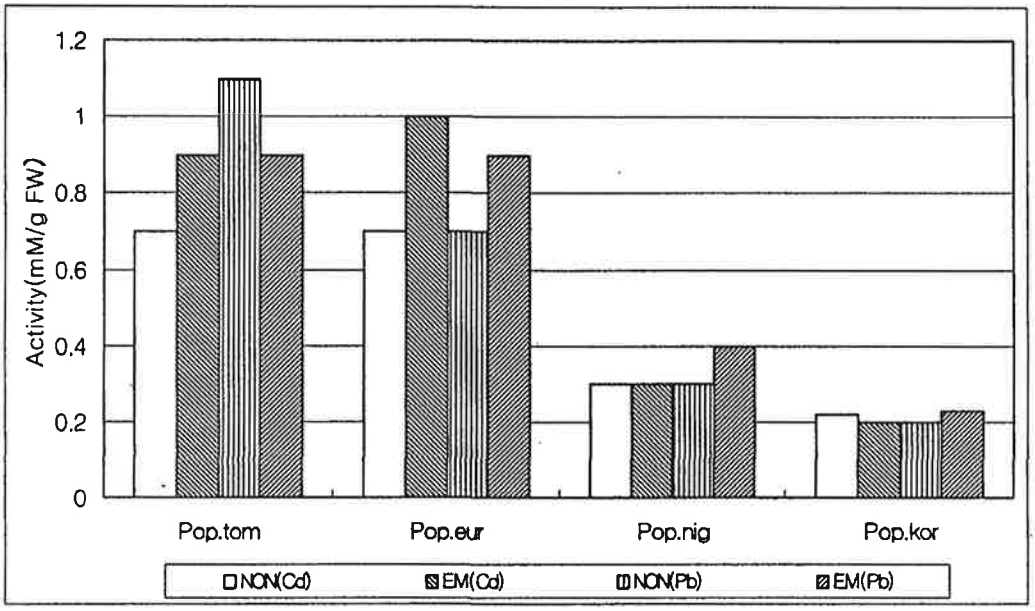


Table 10. Effects of mycorrhizal associate on acid phosphatase activity in roots of four *Populus* species treated with Cd and Pb in soil. Pop.tom=*Populus alba*×*glandulosa*, Pop.eur=*Populus euramericana*, Pop.nig=*Populus nigra*×*maximiwiczii*, Pop.kor=*Populus koreana*×*nigra var. italica*, NON(Cd)=non-mycorrhizal seedlings treated with Cd, EM(Cd)=mycorrhizal seedlings treated with Cd in soil, NON(Pb)=non-mycorrhizal seedlings treated with Pb in soil, EM(Pb)=mycorrhizal seedlings treated with Pb in soil.

마. 뿌리의 질산환원효소(nitrate reductase; NR) 활성 변화

1) 중금속 처리에 따른 효과

질산환원효소는 토양 중의 질산을 동화하는데 있어 가장 중요한 효소 중의 하나이며, 질소 동화 속도를 조절한다. 이러한 질산환원효소의 활성은 질소의 상태와 생장 및 생산성과 상관이 높다(Srivastava, 1980). Pb나 Cd 처리에 대한 식물의 반응은 종에 따라 다르게 나타나며, 유적적, 양료 및 환경 요인이 중금속에 대한 효소의 조절과

종에 따라 다르게 나타나며, 유적적, 양료 및 환경 요인이 중금속에 대한 효소의 조절과 관련되어 나타난다.

Figure 11은 포플러 4종의 Cd와 Pb 처리에 대한 질산환원효소 활성를 나타낸 것이다. Cd가 처리된 4종 포플러의 뿌리에서 측정된 질산환원효소의 활성은 수종에 따라 큰 차이를 보여 주었으나, Cd 처리 농도에 따른 차이는 나타나지 않았다. 수종별로는 이태리포플러가 가장 높은 활성을 보여 주었으며, 수원포플러가 가장 낮은 활성을 나타내었다. 특히 Cd 30ppm이 처리된 수원포플러의 뿌리에서 효소 활성은 매우 낮은 값을 보여 주었다.

질산환원효소의 활성은 *Hydrilla verticillata*와 같은 식물의 경우 Cd 농도가 1.0 μM 이상에서 활성이 저해되며, 유기 질소와 단백질과 같은 질산 동화의 최종 산물보다 Cd 독성에 더 민감하다(Rai, 1998). 그러나 대부분의 중금속에 민감한 식물 효소들은 식물 조직내에서 Cd 이 phytochelatin complex의 형성함으로써 자유 상태의 중금속 량보다 10배에서 100배의 량에서도 Cd^{2+}에 대한 내성을 가질 수 있다(Kneer와 Zenk, 1992).

Pb가 처리된 포플러 4종의 질산환원효소 활성은 수종에 따라 큰 차이를 보여 주었으며, 특히 수원포플러는 매우 낮은 활성을 나타내었고, Pb 50ppm 처리구에서는 이태리포플러가 가장 높은 효소 활성을 보여 주었으며, Pb 300ppm 처리구에서는 현사시나무가 가장 높은 활성을 보여 주었다.

Pb 처리 농도에 따른 차이는 크지 않았으나, 이태리포플러와 수원포플러는 Pb 300ppm을 처리시 효소 활성이 크게 감소하였다. 그러나 현사시나무는 Pb 농도가 증가함에 따라 효소 활성이 증가하는 경향을 보였다.

In vivo 상태에서 질산환원효소 활성은 *Sesamum indicum* 유묘의 뿌리에 공급된 2mM의 Pb에 의해 저해되었으며(Bharti와 Singh, 1993), 이 식물의 뿌리에서 효소 활성의 저해에 미치는 영향은 Pb^{2+}> Cu^{2+} > Cd^{2+}의 순으로 나타났다(Singh 등, 1994).

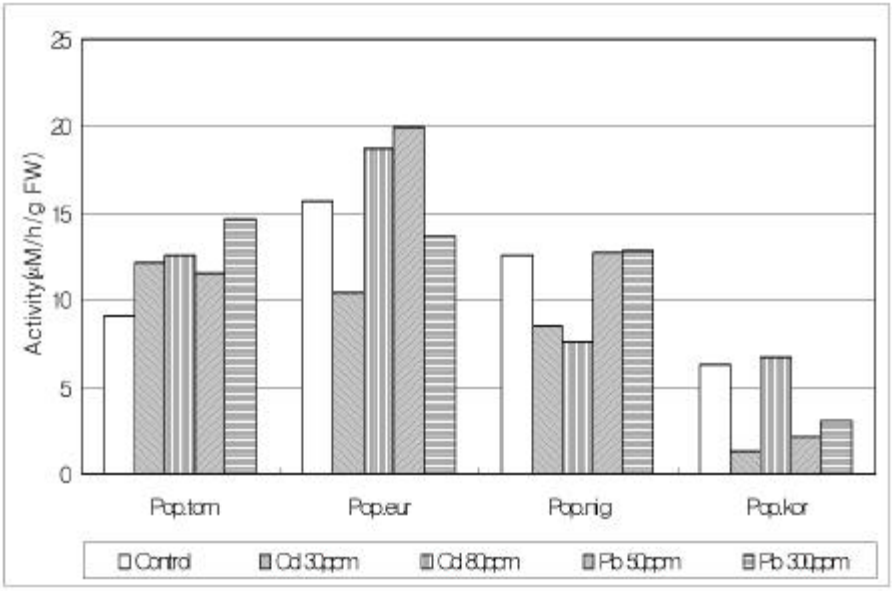


Figure 11. Effects of Cd and Pb exposure on nitrate reductase activity in roots of four *Populus* species. Pop.tom=*Populus alba*×*glandulosa*, Pop.eur=*Populus euramericana*, Pop. nig=*Populus nigra*×*maximiwiczii*, Pop.kor=*Populus koreana*×*nigra var. italica*

2) **균근균 접종에 따른 효과**

포플러의 균근균 접종에 따른 질산환원효소 활성 변화는 Figure 12**에서와 같이 큰 차이를 보이지 않았으며, 이태리포플러를 제외한** 3**종 포플러는 비 접종구에서 질산환원효소의 활성이 높은 경향을 보였다**.

또한 Pb**가 처리된 포플러의 접종에 따른 차이도 나타나지 않았으나**, 4**종 포플러 모두에서 비 접종구에서의 활성이 높은 경향을 보였다**.

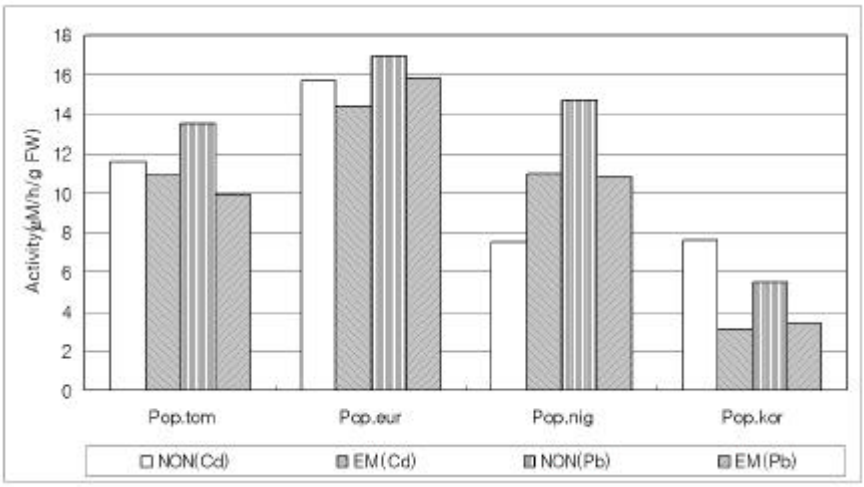


Figure 12. Effects of mycorrhizal associate on nitrate reductase activity in roots of four *Populus* species treated with Cd and Pb in soil. Pop.tom=*Populus alba*×*glandulosa*, Pop.eur=*Populus euramericana*, Pop.nig=*Populus nigra*×*maximiwiczii*, Pop.kor=*Populus koreana*×*nigra var. italica*, NON(Cd)=non-mycorrhizal seedlings treated with Cd in soil, EM(Cd)=mycorrhizal seedlings treated with Cd in soil, NON(Pb)=non-mycorrhizal seedlings treated with Pb in soil, EM(Pb)=mycorrhizal seedlings treated with Pb in soil.

라. 균근균이 접종된 1년생 포플러 이식묘의 생장량

1) 이식묘의 Cd와 Pb 처리에 따른 줄기 생장량 비교

이식된 1년생 포플러의 생장은 중금속 처리별, 수종별 큰 차이를 보여 주었다 (Figure 13). 이태리포플러는 4종 포플러 중 가장 줄기 생장량이 많았으며, 대조구에서의 줄기 생장량은 개체당 평균 112.1g이었으며, Cd 80ppm에서의 줄기 생장량은 개체 당 44.9g으로 가장 적었다. 또한 Cd 30ppm과 Cd 80ppm으로 처리된 이식묘의 줄기 생장량은 모든 수종의 포플러에서 Pb 50ppm으로 처리된 이식묘의 줄기 생장량보다 적게 나타났다. 각 처리 중 Pb 300ppm으로 처리된 이식묘에서 줄기 생장량이

장 컸으며, 모든 수종에서 동일한 결과가 얻어졌다. 이러한 결과는 Cd가 처리된 농도에서 식물의 생장을 저해하고 있음을 보여 주며, Pb는 Cd보다 수목에 대해 독성이 약하고, 300ppm 정도에서도 수목의 생장에 큰 영향을 미치지 않음을 의미한다. 또한 토양의 중금속에 대한 완충능력과 식물의 생장에 따른 체내 중금속 농도의 희석효과에 의해 독성이 감소되었을 가능성도 있다.

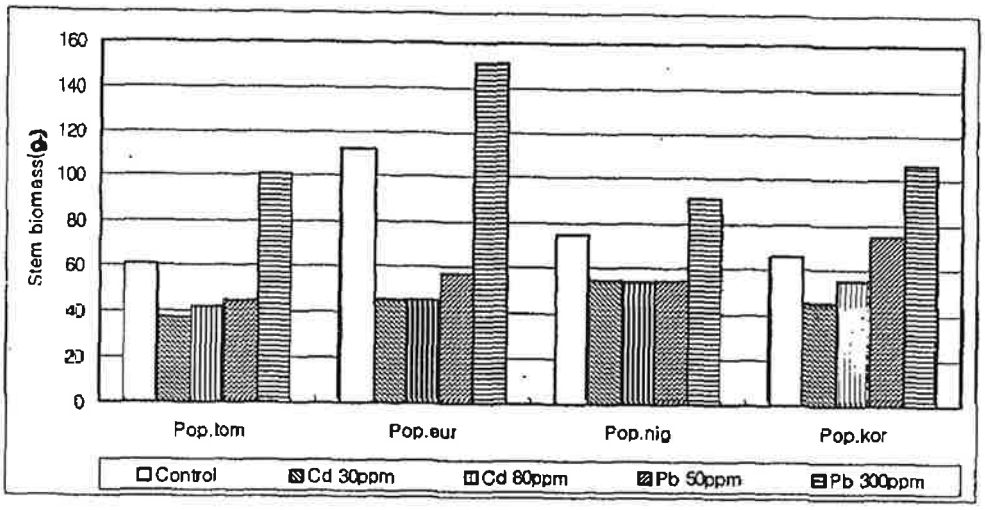


Figure 13. The biomass of stem of four *Populus* species transplanted to soil treated with Cd and Pb. Pop.tom=*Populus alba×glandulosa*, Pop.eur=*Populus euramericana*, Pop.nig=*Populus nigra×maximiwiczii*, Pop.kor=*Populus koreana×nigra var. italica*,

2) 균근균을 접종한 포플러 이식묘의 줄기 생장량 비교

균근균 접종 효과는 Cd와 Pb가 처리된 모든 수종의 이식묘에서 나타났다(Figure 14). 특히 균근균 접종 효과가 좋았던 수종은 현사시나무와 수원포플러였으며, 줄기 생장량은 각각 33%와 30% 정도 증가하였다. 이태리포플러와 양황철도 균근균 접종에 따라 줄기 생장량이 증가하였으나 각각 10%와 20%로 비교적 적은 량이었다.

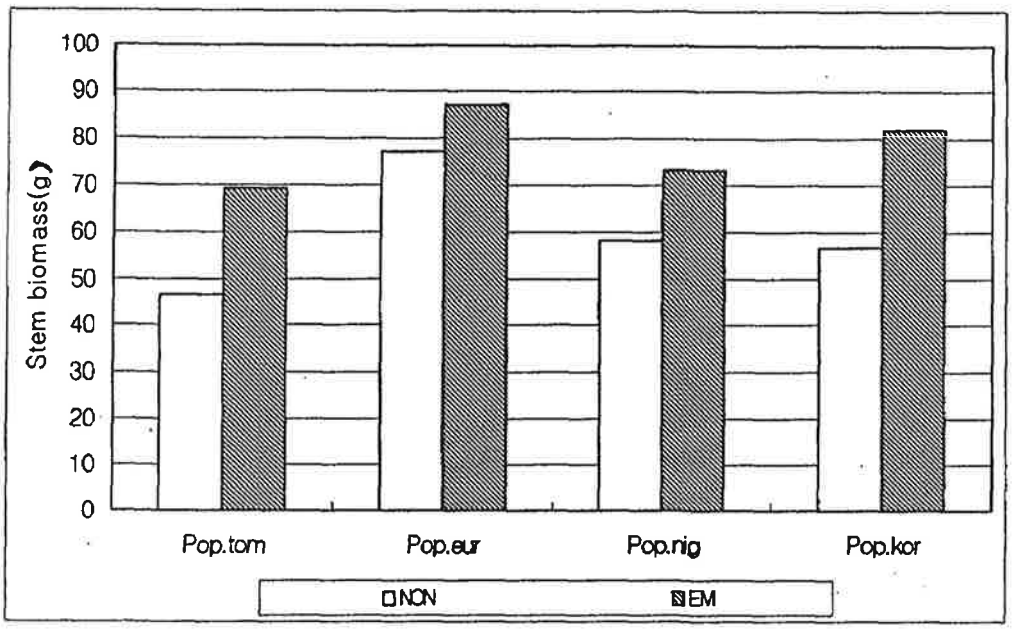


Figure 14. Effects of mycorrhizal associate on the biomass of stem of four *Populus* species transplanted to soil treated with Cd and Pb. Pop.tom=*Populus alba*×*glandulosa*, Pop.eur=*Populus euramericana*, Pop.nig=*Populus nigra*×*maximiwiczii*, Pop.kor=*Populus koreana*×*nigra var. italica*, NON=non-mycorrhizal plant treated with Cd and Pb in soil, EM=mycorrhizal plant treated with Cd and Pb in soil.

第 4 節 結 論

본 연구는 목본식물을 대상으로 중금속에 대한 흡수 특성과 토양 내 축적된 중금속의 농도와 조직 농도와의 상관관계를 밝히고, 중금속에 대한 균근균의 내성, 축적 특성 및 중금속에 대한 균종별 생장 특성을 파악하고자 하였다. 또한 균 접종을 통한 수목에서의 중금속 흡수 능력 및 생리적인 특성 등의 연구를 통해 중금속 흡수 능력을 향상시키는 기술을 개발하여, 향후 목본식물을 중금속 오염지의 토양 정화 및 식생 복원에 이용하기 위한 자료를 제공하고자 하였다.

본 연구에서 조사된 대부분의 폐광산의 주변 토양은 중금속에 의해 오염되어 있었으며, 일부 폐광산의 Zn, Pb의 농도는 독성을 나타낼 수 있는 수준이었다. 특히 광구 중심으로부터 멀어질수록 중금속 농도가 감소하는데, 이것은 오염원 가까이에서 피해가 증가할 수 있음을 나타낸다. 오염지에서 채취된 수목에서의 중금속의 축적 농도는 현사시나무가 가장 높았으며, 부위별 축적 농도는 수종에 따라 큰 차이를 보여 주었다. 또한 토양과 수목간의 중금속 농도의 관계는 매우 높은 정의 상관을 보여주었다.

균근균의 중금속 내성에 대한 연구 결과, 균근균은 각 중금속에 따라 또는, 중금속의 농도에 따라 생장특성, 내성특성 및 축적 특성이 다르게 나타났다. 또한 대부분의 균근균은 중금속에 대해 생장 저해를 받는 것으로 나타났으며, 일부는 생장이 지연되며, 일부 균근균은 중금속에 대한 적응 및 내성 기작을 통하여 생장이 회복되는 현상이 나타났다.

균근균의 접종을 통한 수목에서의 중금속 흡수 능력 및 생리적인 특성을 연구한 결과 대부분의 수목은 균근균의 접종에 따라 중금속의 흡수 능력이 증가되는 것으로 나타났으며, 중금속의 처리 농도가 증가함에 따라 흡수량이 증가하였다. 그러나 중금속 흡수 능력은 수종 및 중금속의 종류에 따라 차이가 있었으며, 중금속의 농도나 균 접종에 따른 생장량의 변화는 없었다. 또한 중금속의 처리 농도에 따라 각 수종별로 생리적인 활성이 저해되거나 촉진되었다. 이것은 중금속 처리와 균근균과의

상호 작용에 의해 나타나는 현상으로 각 수종별 중금속에 대한 내성 및 저항 능력의 차이가 있음을 보여 주었다. 또한 중금속이 처리된 묘목의 이식 후 생장량은 중금속의 농도에 따른 차이는 없었지만 균근균의 접종효과는 크게 나타나 중금속으로 오염된 지역에서 균근균이 수목의 생장에 도움이 될 수 있음을 보여 주었다.

결론적으로 포플러를 포함한 대부분의 수목은 중금속에 대한 흡수 능력이 우수하며, 중금속에 대한 내성을 가지고 있는 것으로 판단된다. 또한 수목에 균근균을 접종하여 중금속의 흡수능력을 향상시킬 수 있으며, 향후 오염된 토양의 정화와 식생복원에 적용 가능하다고 판단되다. 그러나 수목을 이용한 정화 효율을 최대로 높이기 위해서는 자생 균의 선발과 서식 환경 특성이 정확하게 규명되어야 하며, 각 중금속에 대한 균별 생리적인 특성에 대한 추가 연구와 오염지 자생 수목에서의 중금속의 흡수 특성 및 내성 기작에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 한다.

引 用 文 獻

1. **김성조, 백승화**. 1994. **장항제련소 지역의 토양과 수도체중** Cd **및** Zn **함량의 변화**. **한국환경농학지**. 13(2) : 131-141.
2. **정기채, 김복진, 한상국**. 1993. **아연광산 인근지역 야생식물중의 중금속 함량조사**. **한국환경농학회지**. 12(2) : 105-111
3. **農林水産技術協議事務局**. 1972a. **土壤および作物體の分析法**(1). **日本土肥誌**. 43 : 264-270.
4. **農林水産技術協議事務局**. 1972b. **土壤および作物體の分析法**(2). **日本土肥誌**. 43 : 305-311.
5. **農林水産技術協議事務局**. 1972c. **土壤および作物體の分析法**(3). **日本土肥誌**. 43 : 349-356.
6. Garland, T.R., D.A. Cataldo and R. E. Wildung. 1981. Absorption, transport, and chemical fate of plutonium in soybean plants. J. Agric. Food Chem. 29 : 915-920.
7. Greco, M.A., D.I. Hrab, W. Magner, and D.J. Kosman. 1990. Cu, Zn superoxide dismutase and copper deprivation and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. 172: 317-325.
8. Harrison, R.M. and M.B. Chirgawi. 1989a. The assesment of air soil as contributors of some trace metals to vegetable plants. I-Use of a filtered air gorwth cabinet. The Science of the Total Environment. 83 : 13-34.
9. Hartley, J., J.W.G. Cairney and A.A. Meharg. 1997. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? Plant and Soil 189: 303-319.
10. Haselwandter, K., and G.D. Bowen. 1996. Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and land rehabilitation. Forest Ecology and Management.

81:1-17.

11. Heinrichs, H. and R. Mayer. 1980. The role of forest vegetation in the biogeochemical cycle of heavy metals. Journal of Environmental Quality 9 : 111-118.
12. Hutchinson, T.C. and L.M. Whitby. 1974. Heavy metal pollution in the Sudbury mining smelting region of Canada. I-Soil and vegetation contamination by nickel, copper and other metals. Environmental Conservation. 1 : 123-132.
13. Jones, M.D., and T.C. Hutchinson. 1986. The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. New Phytologist. 102: 429-442.
14. Jones, M.D., and T.C. Hutchinson. 1988. The effects of nickel and copper on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. Can. J. Bot. 66: 119-124.
15. Kabata-Pendias, A. and H. Pendias. 1984. Trace Elements in Soils and Plants CRC Press, Boca Raton, Florida. 315pp.
16. Levitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. 2nd ed. Academic Press, New York. 697pp
17. Markert, B. 1993. Plants as Biomonitors. Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment. Weinheim, New York, Basel, Cambridge. pp.343-378.
18. McCreight, J.D. and D.B. Schroeder. 1982. Inhibition of growth of nine ectomycorrhizal fungi by cadmium, lead, and nickel *in vitro*. Environmental and Experimetal Botany. 22: 1-7
19. Morselt, A.F.W., W.T.M. Smits, and T. Limonard. 1986. Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil. 96: 417-420.
20. Ochiai, E.I. 1987. General Principles of Biochemistry of the Elements. Plenum

Press, New York. 461pp

21. Robson, A.D. 1993. Zinc in soils and plants. Kluwer academic publishers Dordrecht. 208pp
22. Ross, S.M. 1994. Toxic Metals in Soil-Plant Systems. John Wiley & Sons Ltd. New York. 469pp
23. Rühling, A.E. Bååth, A. Nordgren, and B. Söderström. 1984. Fungi in metal-contaminated soil near the Gusum brass mill, Sweden. Ambio. 13: 34-36
24. Salt, D.E., M. Blaylock, N.P.B.A. Kumar, V. Dushenkov, B.D. Ensley, I. Chet and I. Raskin. 1995. Phytoremidation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environmental using plants. Bio/Technology. 13 : 468-474.
25. Srivastava, H.S. 1980. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. Phytochemistry. 19: 725-733.
26. Adriano, D.C. 1986. Trace Elements in the Terrestrial Environment, Springer-Verlag, New York, p. 106.
27. Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and Excluders. Journal of Plant Nutrition. 3 : 643-654.
28. Bargagli, R., and F. Baldi. 1984. Mercury and methyl mercury in higher fungi and their relation with the substrate in a Cinnabar mining area. Chemosphere. 13: 1059.
29. Bharti, N, and R, P, Sin호. 1993. Growth and nitrate reduction by *Sesamum indicum* CV PB-1 respond differentially to lead. Phytocheemistry. 33:531-534.
30. Brown, M.T. and D.A. Wilkins. 1985a. Zinc tolerance of *Amanita* and *Paxillus*. Trans. Br. Mycol. Soc. 84: 367-369

31 Brown, M.T., and D.A. Wilkins. 1985b. Zinc tolerance of mycorrhizal *Betula*.

New Phytol. 99: 101-106.

32. Brown, M.T., and I.R. Hall. 1989. Metal Tolerance in Fungi. pages 95-104. in A.J. Shaw. Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC press, Inc, Boca Raton, Florida.

33. Brown, S.L., R.L. Chaney, J.S. Angle and A.J.M. Baker. 1994. Phytoremidation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc-and cadmium-contaminated soil. Journal of Environmental Quality. 23 : 1151-1157.

34. Chamberlain, A.C. 1983. Fallout of lead and uptake by crops. Atmospheric Environment. 17 : 693-706

35. Colpaert, J.V. and J.A. Van Assche. 1987. Heavy metal tolerenace in some ectomycorrhizal fungi. Funct. Ecol. 1: 415-421

36. Colpaert, J.V. and J.A. Van Assche. 1992. The effects of cadmium and the cadmium-zinc interaction on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil. 145: 237-243

37. Colpaert, J.V. and J.A. Van Assche. 1992. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. Plant and Soil. 143 : 201-211.

38. Cumming, J.R. and A.B. Tomsett. 1992. Metal tolerance in plants: Signal transduction and acclimation mechanisms. pages 329-364 in D.C. Adriano ed. Biogeochemistry of Trace Metals. Lewis, Boca Raton.

39. Egerton-Warburton L.M. and B.J. Griffin. 1995. Differential responses of *Pisolithus tinctorius* isolates to aluminium *in vitro*. Can. J. Bot. 73: 1229-1233.

40. Gadd, G.M. 1992. Metals and microorganisms: a problem of definition. FEMS Microbiology letters. 100: 197-204.

41. Gadd, G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologist. 124: 25-60.

42. Gadd, G.M., and C. White. 1989. Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeasts. pages 19-38 in Poole, R.K., and G.M. Gadd. ed. Metal-Microbe Interactions. Oxford IRL Press.

43. Galiazzo, F., M.R. Ciriolo. M.T. Carri, P. Civitareale, L. Marmocchi, F. Marmocchi, G. Rotilio. 1991. Activation and induction by copper of Cu/Zn superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Biochemistry. 196: 545-549.

44. Hiscox, J.D., and G.F. Israelstam. 1979. A method for the extration of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can. J. Bot. 57:1332-1334.

45. Huang G. Y. F.A. Bazzazz, and I.N. Vanderhoeff. 1974. The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. Pl. Physiol. 54: 122-124.

46. Kneer, R., and M. H. Zenk. 1992. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoing. Phytochemistry. 31:2663-2667.

47. Krupa Z. 1988. cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a, b protein complex II in radish cotyledons. Physiol. planta. 73: 518-524.

48. Kupper, H., F. Kupper and M. Spiller, 1996. Environmental relevance of heavy metal -substituted chloroohylls using tthe example of water plants. Journal of Experimental Botany. 47:259-266

49. Macfall, J., S.A. Slack, and J. Iyer. 1991. Effects of *Hebeloma arenosa* and phosphorus fertility on root acid phosphatase activity of red pine(*Pinus resinosa*) seedlings. Can. J. Bot. 69:380-383.

50. Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. Phytopathology. 59: 153-163

51. Rai, U.N., M.Gupta, R.D. Tripathi and P. Chandra. 1998. Cadmium regulated

nitrate reductase activity in *Hydrilla verticillata* (I.F.) Royle. Water, Air, and Soil Pollution. 106 : 171-177.

52. Shaw, A.J. 1989. Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp.95-104.

53. Shoeran I.S.., H.R. Singal, and R. Sin호. 1990. Effect of cadmium and nikel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea(*Cajanus cajan*). Photosynthesis Res. 23:345-351.

54. Simon, L., H.W. Martin and D.C. Adriano. 1996. Chicory(*Cichorium intybus* L.) and dandenlion(*Taraxacum officinale* Web.) as phytoindicators of cadmium contamination. Water, Air, and Soil Pollution. 91: 351-362.

55. Singh, R.P., N. Bharti and G. Kumar, 1994. Differential toxicity of heavy metals to growth and nitrate reductase activity of *Sesamum indicum* seedlings. Phytochemistry 35: 1153-1156.

56. Turnau, K, and J. Dexheimer. 1995. Acid phosphatase activity in Pisolithus arrhizus mycelium treated with cadmium dust. Mycorrhiza. 5:205-211.

57. Vallee, B.L. and D.D. Ulmer. 1972. Biochemical effects of mecury cadmium, and Lead. Ann. Rev. Biochem. 41: 91-128.

제 2 장 중금속 결합 단백질 유전자 도입에 의한 토양 중금속 제거 수목의 육성

산 림 청 육종부
연구책임자 : 손 성 호
연 구 원 : 문 흥 규
연 구 원 : 김 대 혁
연 구 원 : 최 영 임
연 구 원 : 이 은 정

第 1 節 緖 說

산업화에 따른 환경오염은 날로 심각해져 환경오염물질의 농도는 대기 및 수질은 물론 토양 중에서도 심각한 수준에 이르고 있다.

대부분의 중금속은 용액 중에서 +의 전하를 띠고 있어서 토양중의 유리 산화물, 유기물, 점토광물에 특이적으로 흡착된다. 납의 경우 흡착력은 칼슘의 1,000- 10,000 배로 정도로 알려지고 있으며, 이 때문에 흡착된 중금속 원소는 좀처럼 토양 중에서 제거되지 않는다. 이들 중금속의 또 한가지 특성은 이동성이 매우 작은 것으로 0 내지 수 cm의 토양 깊이에 축적되는 경향이 있다. 공단 주위의 토양 중금속 함량이 높아지는 원인으로는 산업활동에 따른 분진 또는 에너지로 사용되는 연료의 연소시 매연에 의한 축적형태로 알려져 있다.

금속광산, 제련소, 도시하수 및 농약 등을 주 오염원으로 하는 중금속 오염은 대부분 유기물이나 무기염류와는 달리 비 분해성이기 때문에 장기간 토양 중에 잔류, 축적되어 각종 식물의 성장과 발달에 저해 요인으로 작용할 뿐 아니라, 먹이사슬을 통해 인체 내로 섭취될 경우 간 등의 주요기관에 축적되어 각종 질병을 유발시킬 위험성을 가지고 있다. 납의 경우 다량의 납이 체내에 들어오면 복통, 구토 설사, 위경련 등의 급성 중독을 일으킨다. 비소에 의한 급성 중독은 콜레라 모양의 구토, 만성 증상은 피부가 검어지고 발한 증상을 수반한다. 또한 카드뮴의 경우는 토양 중에 과잉이면 식물의 황하현상을 일으키며 토양 방지법에 의한 유해물질로 지정되어 있다. 그러므로 생태계의 독성 중금속 제거는 시급히 해결해야할 과제이다.

그러나 이러한 중금속 오염의 피해를 한 가지 방법으로 방지 할 수는 없다. 오염을 미연에 방지하기 위하여 농자재나 토양 개량용 슬러지 등에 들어있는 독성금속의 수준에 대한 엄격한 규제가 선행되어야 하고 대기로부터 유입되는 중금속의 경우는 인접국가간의 공동의 노력에 의해서만 오염원을 감소시킬 수 있다. 그러나 일단 오염된 토양에 대한 정화는 그 피해가 즉각적으로 나타나므로 처리를 지연시킬 수 없

다. 토양은 본래 화학 물질에 대해 유기물 자정 작용을 어느 정도는 할 수 있으나 그 양이 한계치 이상 존재할 때는 문제가 발생한다. 이러한 이유로 여러가지토양 정화법이 최근 소개되고 있다.

미국의 경우 중금속에 대한 정화 비용으로 년간 70억불이상 또한 중금속과 다른 유기화합물의 복합적인 오염에 대한 정화비용으로 350억불 이상이 소요되는 것으로 추정하고 있다 이러한 토양정화법에는 오염된 토양을 굴착하여 일정장소에 오염토양을 매립하거나 화학적으로 중금속을 부동화시키거나 불용화시키는 방법, 산성 용액 등으로 용탈 시키는 방법 등 기존에 여러 가지 방법이 개발 또는 연구 중에 있다.

그러나 그러한 접근 방법은 비용이 막대하여 넓은 면적에 적용하기 어려운 단점이 있다. 최근 생물체를 이용한 중금속 오염토양의 제거법으로 관심을 끄는 bioremidiation 방법이 있으며, 그 중 식물을 이용하는 phytoremediation이 대표적인 방법으로 세계적으로 관심이 집중되고 있는 분야이다.

중금속을 흡수하는 식물은 영구적으로 오염된 토양으로부터 중금속을 흡수하는데 기여할 수 있으며, 장기적인 토양의 개량 효과를 이룰 수 있으므로 식물을 이용한 중금속의 저항성, 흡수력 등에 대한 연구가 오염지나 척박지의 복원 및 오염도 감소를 위한 토양 환경 개선의 측면에서 빠른 시일 내에 진행되어야 한다.

동물의 경우 과도한 중금속 물질에 대항하는 방법으로 metallothionein, ferritin등의 단백질을 합성해 이들 단백질로 하여금 일부 중금속과 결합하여 저장, 운반, 무독화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 식물의 경우는 그 성장과 발달에 필요로 하는 일부의 중금속(Mn, Zn, Cu, Mg, Mo, possibly Ni)과 아직 그 생물학적 기능이 잘 알려져 있지 않은 Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se등의 미량원소도 식물 체내에 축적시킨다. 식물에서도 중금속 결합단백질인 ferritin이 정제되어 그 특성의 일부가 밝혀진 바 있으며 이 ferritin은 Fe^{3+} 뿐만 아니라 Cu^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, Bd^{2+}, Al^{3+} 등과도 *in vitro*와 *in vivo*에서 모두 결합할 수 있어 이 ferritin을 이용한 중금속 이온들의 정화 가능성이 제기되었다. 이밖에도 중금속 해독 단백질인 metallothionein은 작은 분자량을 가진 단백질로 cystein함량이 높은 부위를 포함하며 Ag, Zn, Cu, Cd,등의 중금속과 결합하는 성질이 있고 동식물을 포함한 미생물에 존재함이 밝혀졌다. 그러나 식

물의 경우 최근 완두, 옥수수, 애기장대 그리고 개화식물인 *Mimulus guttatus*의 경우 metallothionein유전자의 존재가 제시되고 있으나 현재 밀에서 보고된 Zinc-binding metallothionein인 Ec를 제외한 식물에서의 그 기능과 존재는 확인되지 않았다.

최근의 유전공학 발달로 다른 생물의 유전자를 도입하여 식물에 새로운 기능을 부여하는 연구가 현재 활발히 진행되고 있다. 중금속 흡착 능력을 가진 사람의 metallothion 유전자 등도 식물체에서 발현 할 수 있도록 재조합하여 식물체내에 도입한 결과 transgenic tabacco에서 중금속에 높은 저항성을 보임이 확인되었다.(Misra and Gedamu, 1989). 이미 미생물의 수은 저항성 등을 포함한 다양한 유전자 산물인 단백질 등이 중금속과 결합하여 무독화시킬 수 있음이 증명되었다. 따라서 이러한 유전공학적 접근을 통한 중금속 흡수 식물체의 개발은 토양 오염 중금속 제거에 가능성을 제시하고 있다.

본 실험에서 사용한 포플러는 목본류 중 재분화 체계가 가장 잘 확립되어져 있어 형질전환에 유리한 조건을 갖추고 있다. 또한 속성수로서 빠른 생장율을 보이며 biomass가 풍부함으로 오염지에 도입되었을 때 빠르게 성장시킬 수 있으며 무성번식이 용이하여 동일한 clone을 대량으로 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다.

따라서 최근 획기적인 발전을 보여온 유전공학을 이용한 외래 유전자의 삽입 및 발현 기법을 이용하여 수목의 형질개량과 개량형질의 안전한 유전을 가능케 하여 중금속제거를 위한 수목의 형질개량에 매우 유익하리라 기대된다. 본 실험에서는 지금까지 많은 연구가 이루어진 사람의 ferritin 유전자와 쥐의 metallothionein 유전자를 포플러에 도입, 발현시킴으로써 우리 주변의 토양에 매우 심각하게 오염된 중금속을 정화할 수 있는 수목을 개발하고자 하였다.

第 2 節 材料 및 方法

1. 중금속 결합단백질 유전자인 metallothionein 및 ferritin 유전자의 cloning

본 연구에서는 유전자 염기서열이 밝혀진 rat(*Rattus norvegicus*, Anderson et al., 1986)의 class-I metallothionein 유전자의 염기서열을 바탕으로 PCR primer로 사용될 수 있는 5'primer (5'-TCGTCACTTCAGGCACAGCA-3'), 3'primer (5'-TCGTCACTTCAGGCACAGCA-3')을 합성하였다.

class-I metallothionein 유전자는 rat로부터 분리한 mRNA로부터 역전사효소 reverse transcriptase를 사용하여 first strand cDNA를 합성한 후 PCR을 initial denaturation (94℃, 4분), primer annealing(55℃ 30초), DNA polymerization(72℃ 2분) denaturation(94℃ 30초)단계를 거치는 3단계 과정을 30회 반복하고 마지막 cycle의 DNA 합성과정에서 5분간 last extension 반응을 시켜 PCR 산물을 1%의 agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동한 208bp의 PCR product를 elution 한 후 pGEM-T (Promega社) vector에 cloning 하였다.

Ferritin 유전자의 cloning은 5'primer(5'-GAATTCATGGATTCCCAGGTCCGC-3')와 3'primer(5'-GGATCCTCATGGGTGGGACACAGGTTA-3')을 이용하여 중금속에 오염된 환경에서 자란 올챙이의 mRNA를 분리 한 후 metallothionein 유전자와 동일한 방법으로 pGEM-T vector에 cloning 하였다.

2. Metallothionein 및 ferritin 유전자의 식물체내 도입을 위한 유전자의 재조합

Metallothionein 및 ferritin 유전자를 식물로 도입 및 발현시키기 위하여 식물 발현용 유전자 운반체와 재조합을 하였다. 식물 유전자 운반체로는 binary vetor pMY10을 사용하였다. 도입 유전자의 발현을 결정하는 5'-조절인자는 식물 virus인 cauliflower mosaic virus(CaMV)에서 유도된 항시성 promoter인 35S promoter(Sanders *et al.*, 1987)와 이것에 enhancer부위를 부착한 duplicate 35S

promoter를 사용하였다. 또 이 재조합 운반체는 형질전환 세포의 선발을 위하여 bacteria의 neomycin phosphotransferase II(*npt* II)를 함유하고 있어 항생제 가나마이신에 의해 형질전환 세포를 선발하였다.

3. Metallothionein 및 ferritin 유전자의 포플러내 도입

가. 포플러의 무균재료 확보

포플러의 기내 무균 재료 확보를 위해 임목육종연구소 구내포지에 보존중인 채수포에서 절단한 후 70%에탄올(5분), 2% 차아염소산 나트륨(20분)으로 표면 살균 후 MS+BAP 0.2mg/L 배지에서 4주간 배양하여 줄기를 발생시켰다. 발생된 줄기를 1/2 MS 배지로 계대 배양하여 발근시킨 후 4주간 배양하여 성장시킨 후 형질전환의 시료로 이용하였다.

나. 공조배양

MT 및 ferritin 유전자가 들어있는 *A. tumefaciens* LBA 4404를 기내 절간 조직과 20분간 공조배양하여 2일간 MS＋2.4-D 1.0㎎/ℓ, BA 0.1mg/ℓ, NAA 0.01에서 암배양한다음 가나마이신이 포함된 CIM 배지(MS＋2.4-D 1.0㎎/ℓ, BA 0.1mg/ℓ, NAA 0.01㎎/ℓ)로 계대 배양하여 형질전환된 callus를 유도하였다.

1) 형질전환체 유도 및 발근

가나마이신이 첨가된 CIM 배지에서 캘러스가 형성되면 WPM＋zeatin 1.0, BA 0.1, NAA 0.01㎎/ℓ 첨가된 배지로 계대하여 줄기를 유도하였다. 유도된 줄기는 가나마이신이 포함된 1/2MS 배지로 계대배양하여 발근시키고 줄기를 신장시켰다. 발근된 식물체는 BA 0.2 ㎎/ℓ이 첨가된 배지에서 증식시켰다.

2) 재분화된 식물체의 유전자 삽입 및 발현 확인

유전자의 삽입 및 발현을 확인하기 위하여 형질전환된 식물체를 *npt* II assay,

genomic PCR 및 RT PCR을 실시한 후 1% agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 capillary transfer 방법으로 이전시킨 후 *npt* II, ferritin DNA 및 MT DNA probe과 hybridization을 실시하였다.

4. 중금속에 대한 저항성 및 정화능력의 확인

가. *In vitro*에서 중금속에 대한 정화능력의 확인

CdCl2를 농도별로 첨가한 배지(0, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.5mM)에서 control 식물체와 형질전환된 기내 식물체를 1/2MS control 배지에서 4주간 배양하여 줄기 발생율을 조사하였다. 또한 0.1mM CdCl2를 첨가한 배지에서 4주간 배양한 식물체를 질산을 이용하여 회화시킨 후 ICP를 이용하여 형질전환체와 대조 식물체의 중금속의 축적 능력을 분석하였다.

나. 현탁 배양을 이용한 중금속 내성 실험

세포 수준에서 중금속에 대한 내성을 검정하기 위하여 캘러스 배지에서 4주간 배 배양된 캘러스를 액체배지에서 4주간 현탁 배양하여 세포의 안정화를 유도한 후 2가의 중금속 (CdCl2, FeSO4, PbCl2)를 처리 한 후 원형질막의 손상은 Evans blue 염색 후 분광광도계로 흡광도를 측정하여 추정하였다. 또한 포유동물의 mitochondria활성을 측정한 Mosmann(1983)의 방법에 근거를 둔 것으로 Ikekawa 등(1998)이 식물 세포에 적합하도록 변형시킨 방법을 사용하여 MTT를 이용한 mitochondria의 활력을 조사하였다.

또한 PbCl2가 처리된 배지에서 현탁배양된 세포 2ml를 plating하여 세포의 성장을 측정하였다.

다. 수경재배를 이용한 내성 검정

중금속에 대한 결합능력 및 내성을 검정하기 위하여 수경재배액에 0, 0.1, 0.5mM의 CdCl2를 각각 처리한 후 줄기 발생율을 비교하였다.

라. 중금속 축정량의 분석 및 polyamine 분석

중금속 스트레스에 대하여 식물체내 polyamine 함량 분석을 실시하기 위하여 수경재배한 시료를 200mg sampling 하여 5% percolic acid 용액에서 3회 반복하여 얼렸다 녹인 후 polyamine을 추출하고 dansyl chloride를 이용하여 dansylation 시킨 후 HPLC로 polyamine 함량을 분석하였다.

5. 정화능력이 뛰어난 개체의 선발 및 증식

형질전환된 기내 식물체에 0.1mM의 CdCl2를 처리하여 식물체의 생존율을 조사한 후 가장 생존율이 높은 개체를 선발하여 줄기증식배지에서 증식한 후 발근배지에서 발근을 유도한 후 온실에서 순화시켜 포트묘 육성하였다.

第 3 節 結果 및 考察

1. 중금속 결합단백질 유전자인 metallothionein 및 ferritin 유전자의 cloning

Rat(*Rattus norvegicus*, Anderson et al., 1986)의 class-I metallothionein 유전자는 rat 으로부터 분리한 mRNA로부터 RT-PCR을 이용하여 208bp 유전자를 증폭하여 이 유전자 절편을 pGEM-T vector에 cloning 하였다.

Ferritin 유전자는 중금속에 오염된 환경에서 자란 올챙이로부터 561bp 유전자 절편을 PCR 이용하여 cloning 하였다.

2. Metallothionein 및 Ferritin 유전자의 식물체내 도입을 위한 재조합 유전자의 제조

특성화된 Metallothionein 및 Ferritin 유전자를 식물로 도입 및 발현시키기 위하여 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid에서 유도된 식물 발현용 유전자 운반체와 재조합을 하였다. (Fig. 1, 2, 3) 도입 유전자의 발현을 결정하는 5'-조절 인자는 식물 virus인 cauliflower mosaic virus(CaMV)에서 유도된 항시성 promoter인 35S promoter와 이것에 enhancer 부위를 부착한 duplicdate 35S promoter(Fig. 2)를 이용하였다.

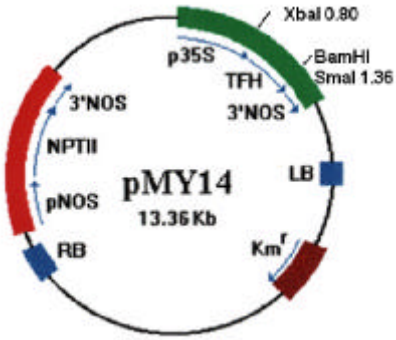


Fig. 1 Ferritin 유전자의 식물 발현을 위한 vector pMY14의 유전자 배열

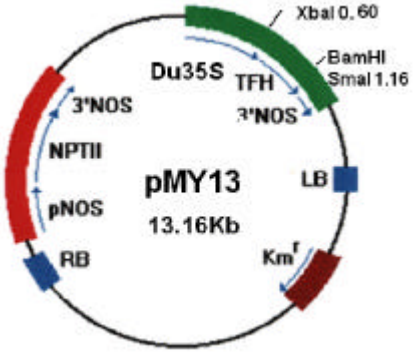


Fig. 2 Ferritin 유전자의 식물 발현을 위한 vector pMY14의 유전자 배열

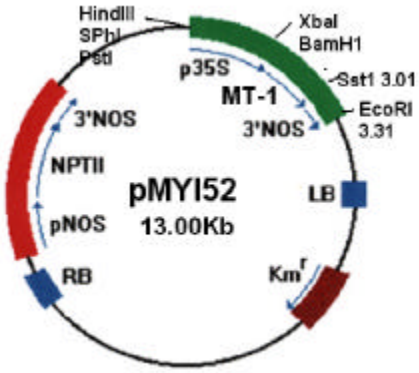


Fig. 3 Metallothionein 유전자의 식물 발현을 위한 vector pMY152의 유전자 배열

3. Ferritin 및 metallothionein 유전자의 포플러내 도입

가. 공조배양

Ferritin 및 metallothionein 유전자의 삽입을 위해 *A. tumefaciens*과 기내 절간조직과 20분간 공조배양을 실시하였다. 감염 후 0.85% NaCl 용액으로 씻어내어 *Agrobacteria*가 과도히 자라는 것을 방지하였다. 감염된 절편체는 캘러스유도 배지 (MS+2.4-D 1.0, BA 0.1, NAA 0.01㎎/ℓ)에 이식하여 2일간 암배양한 다음

kanamycin이 첨가된 캘러스 유도 배지로 계대하였다.

나. 형질전환 캘러스 유도

예비 실험을 실시한 결과 형질전환되지 않은 포플러의 기내조직은 30㎎/ℓ의 kanamycin농도에서 모두 고사하였다. 그러므로 형질전환 캘러스는 50㎎/L kanamycin 배지에서 선발하였다. 형질전환체로 추정되는 캘러스는 절편체의 절단면에서 형성되기 시작하였으며 일단 캘러스형성이 육안으로 관찰되면 재분화 배지로 계대하였다. 형질전환 캘러스 형성율은 87% 정도였다. kanamycin이 첨가된 배지에서 형질전환된 캘러스는 약 4주 후에 유도되었다. (Fig. 4}

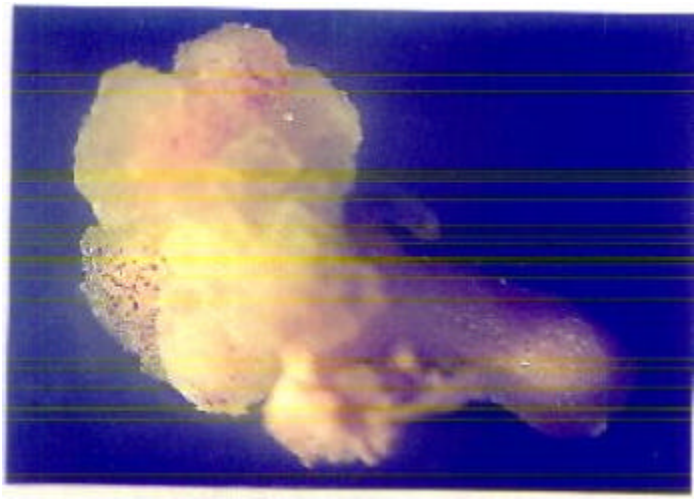


Fig. 4 Kanamycin이 포함된 캘러스 유도 배지에서 선발된 형질전환된 캘러스

4. 형질전환 줄기 유도 및 증식

가. 줄기 유도 및 증식

형질전환된 것으로 추정되는 캘러스는 WPM+zeatin 1.0, BA 0.1, NAA 0.01 ㎎/ℓ**와** 50㎎/ℓ kanamycin, 500㎎/ℓ cefotaxime**이 첨가된 배지에서 식물체 재분화를 유도하였다**(Fig 5}. **형질전환된 캘러스로부터 줄기유도율은 약** 80%**내외로 높은 재분화율을 나타내었다**.

분화된 줄기의 증식은 MS**배지에** BA 0.2㎎/ℓ**을 이용하였다**. **증식된 줄기는** 1/2 MS+IBA 0.1㎎/ℓ **배지에서 발근시킨 후 인공배양토에서 순화시켜**(Fig. 6) **온실로 이식하였다**.(Fig 7)

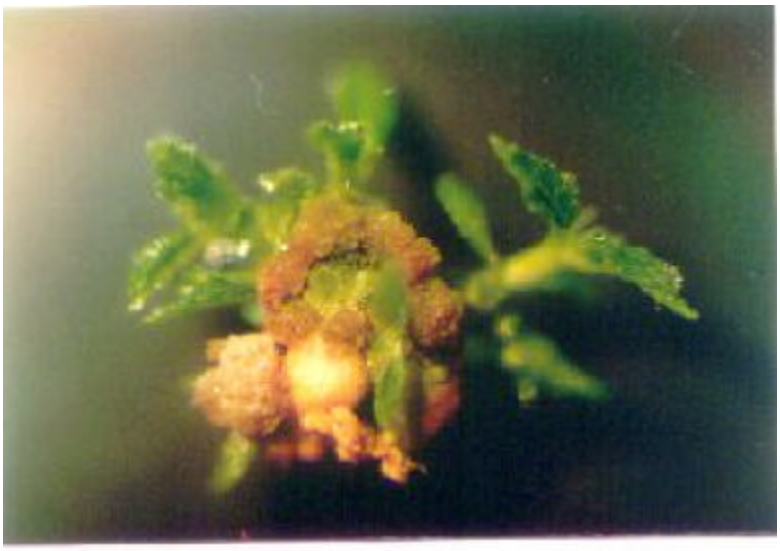


Fig. 5 **형질전환된** callus**로부터 분화된 식물체**

Fig. 6 **인공배양토에서 순화중인 형질전환체**

Fig. 7 **온실로 이식하여 성장시킨 형질전환체**

5. 재분화된 식물체의 유전자 삽입 및 발현 확인

Ferritin 유전자가 삽입된 식물체와 metallothionein 유전자의 삽입을 확인하기 위하여 캘러스에서 분화되어 형질전환된 것으로 추정되는 줄기를 재료로 NPT II assay를 실시한 결과 control 식물체와 비교하여 높은 npt II activity를 보임으로써 유전자가 안정적으로 발현됨이 확인되었다.(Fig 8)

Ferritin 유전자가 삽입된 식물체의 genomic DNA를 분리한 후 PCR로 증폭하여 유전자의 안정적 삽입을 확인하였다(Fig. 9).

유전자의 발현을 확인하기 위하여 control 식물체와 형질전환 식물체의 total RNA를 분리 한 후 reverse transcriptase를 이용하여 역전사 시킨 후 PCR 증폭을 실시한 후 RT PCR 산물을 NPTII DNA 및 ferritin DNA probe와 hybridization 시킨 결과 ferritin 유전자가 삽입된 식물체에서 삽입된 유전자가 정상적으로 발현되고 있음을 확인하였다.(Fig. 10)

또한 Metallothionein 유전자가 삽입된 식물체의 genomic DNA를 분리한 후 PCR로 증폭하여 유전자의 안정적 삽입을 확인하였다.(Fig. 11) 그리고 metallothionein 유전자가 삽입된 식물체의 total RNA를 분리한 후 RT-PCR로 증폭한 결과 metallothionein 유전자가 정상적으로 삽입되어져 발현됨이 확인되어졌으며 metallothionein probe과 hybridization 시킨 결과 metallothionein유전자가 삽입된 식물체에서 삽입된 유전자가 정상적으로 발현되고 있음을 확인하였다.(Fig. 12)

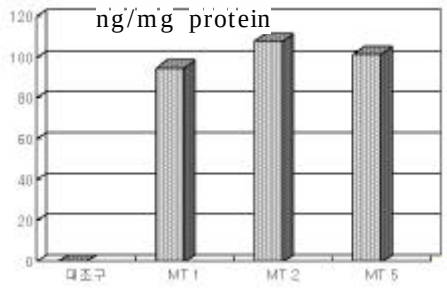


Fig. 8 ELISA를 이용한 metallothionein 유전자가 도입된 형질전환체의 NPT II activity 분석

C 1 2 3 4 5

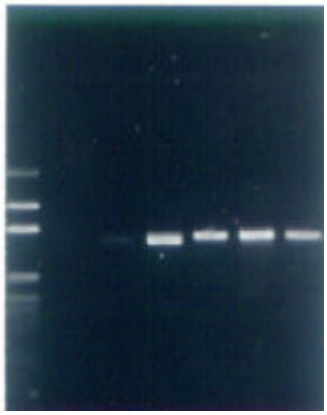


Fig. 9 Genomic PCR분석으로 확인된 형질전환체의 ferritin 유전자

C : control plant, 1-5 : 형질전환체

A B

C 1 2 3 4 C 1 2 3 4

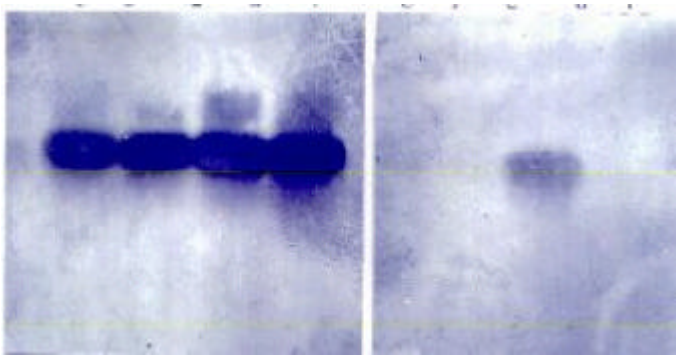


Fig 10. DNA probe를 이용한 RT-PCR 산물의 확인(A: NPT II B: ferritin gene)

C : control plant, 1-4 : 형질전환체

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

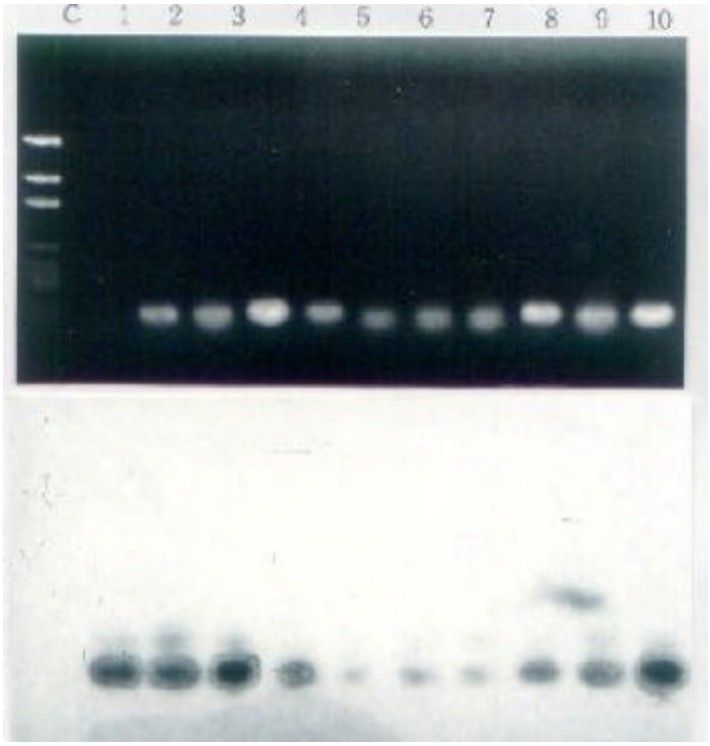


Fig 11. Genomic PCR에 의한 metallothionein 유전자의 삽입 확인 및 DNA probe를 이용한 genomic PCR 산물의 확인

C : control plant, 1-10 : 형질전환체

1 2 3 4 C 1 2 3 4 C

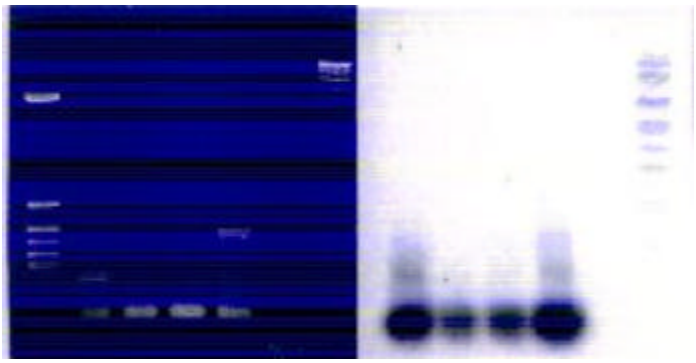


Fig. 12 RT-PCR에 의한 metallothionein 유전자 현질전환체의 유전자 발현 확인 및 DNA probe를 이용한 RT-PCR 산물의 확인

C : control plant, 1-4: 형질전환체

6. 중금속에 대한 저항성 및 정화능력의 확인

가. In vitro에서 중금속에 대한 저항성 및 정화능력의 확인

CdCl2를 농도별로 첨가한 배지(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5)에서 control 식물체와 형질전환된 기내 식물체를 재료로 중금속에 대한 저항성을 실험한 결과 0.1mM CdCl2 농도까지는 control 식물체와 형질전환체는 줄기 발생율에 차이를 보이지 않았으나 0.5mM CdCl2 농도에서는 줄기 발생율에 차이가 관찰되었다.(Fig13,14)

또한 0.1mM CdCl2 배지에서 생장시킨 형질전환체와 control plant를 ICP를 이용하여 중금속의 축적능력을 분석한 결과 형질전환체가 control 식물체보다 높은 축적량을 보였다(Fig. 15).

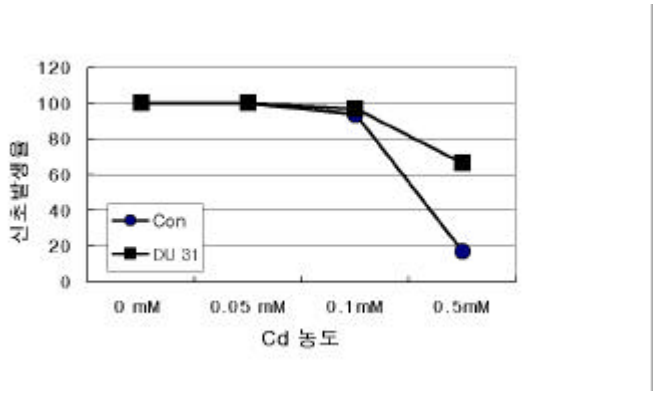


Fig 13. **배지내** CdCl2 **처리에 따른 기내 줄기 발생율**

Fig 14. **배지내** 0.1mM CdCl2 **처리에 따른 기내 줄기 발생**

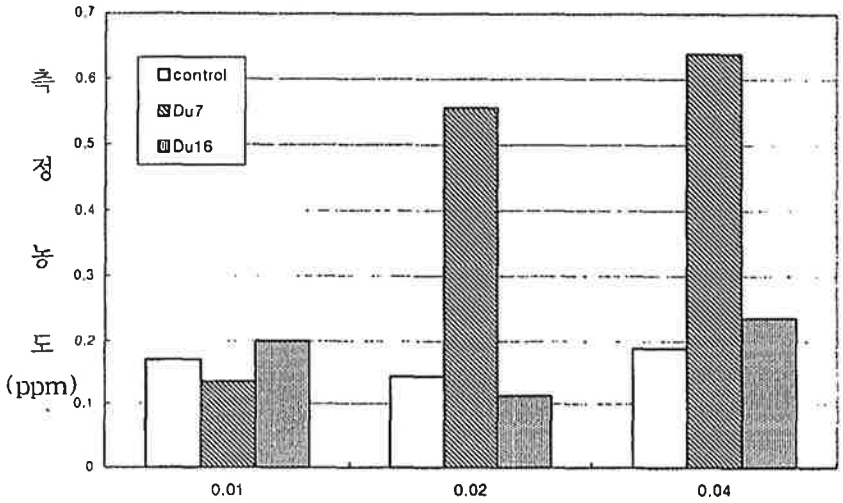


Fig 15. ICP분석으로 식물체내 중금속 축적량 분석

Du7, Du16 :형질전환된 식물체 clone

나. 현탁 배양을 이용한 중금속 내성 실험

세포수준에서 중금속에 재한 결합능력 및 내성을 검정하기 위하여 4주간 배양된 callus를 현탁배양하여 $FeSO_4$, $PbCl_2$,를 처리 한 후 원형질막의 손상은 Evans blue 염색 후 분광광도계로 흡광도를 측정하여 추정하였다. MTT를 이용한 mitochondria의 활력을 조사하였다. $FeSO_4$ 500, 1500μmol을 처리하여 24시간 후 형질전환체와 control plant의 MTT 및 evans blue 값을 조사하였다(Fig. 16). 원형질막 손상을 나타내는 evans blue 값은 control plant와 형질전환체를 비교한 결과 형질전환체가 비교적 원형질막 손상이 적은 것으로 나타났다. 미토콘드리아의 활성을 측정하는 MTT도 약간의 차이를 보이는 것으로 나타났다. 그러나 $PbCl_2$를 처리한 경우는 배지내의 양분과 반응으로 침전물이 생겨서 세포 생장 억제를 구명할 수 있는 적합한 농도를 확인 할 수 없었다.

또한 $PbCl_2$의 경우는 처리된 배지에서 현탁배양된 세포 2ml를 agar plate에

plating한 경우에도 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다. 이 결과는 아직은 실험수가 많지않기 때문에 결론을 내리기 어렵지만 ferritin 단백질이 납에는 효과가 없을지도 모른다는 것을 암시한다.

A B

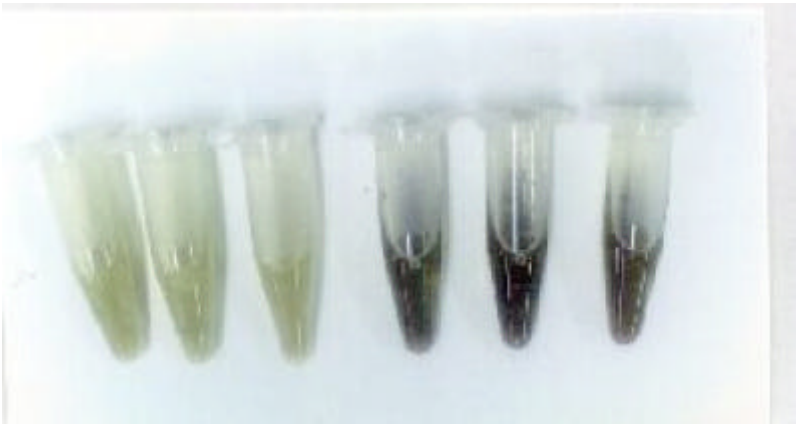


Fig. 16 MTT를 이용한 미토콘드리아의 활력 조사
A : 죽은세포 B : 살아 있는 세포

다. 수경재배를 이용한 내성 검정

수경재배로 형질전환체와 control 식물체의 중금속에 대한 결합능력 및 내성을 검정하였다. 수경재배액에 0mM , 0,1mM, 0.5mM의 $CdCl_2$를 각각 처리한 후 줄기 발생율을 비교하였다. 그 결과 형질전환체는 control 식물체와 비교하여 높은 줄기유도율을 보였다. (Fig. 17, 18) 또한 토양조건과 유사하게 pH를 5.5 로 조정하고 같은 실험을 반복한 결과도 동일하였다.(Fig 19)

중금속 스트레스에 대하여 식물체내 polyamine 함량 변이를 실시한 결과 polyamine 분석 결과는 control plant는 putresecine보다 spermidine변이에 더 많은 변이를 보이는 것이 관찰되었다. Polyamine 분석결과 형질전환체 보다 control plant가 polyamine 변화가 더 심한 것은 $CdCl_2$ 처리가 control plant에 더 민감하게 작용

했기 때문으로 생각된다.(Fig 20) 그러나 일반적으로 스트레스 반응은putresecine이 더 민감하기 때문에 본 실험의 결과는 앞으로 다른 중금속의 스트레스를 처리한 결과와도 관련지어 비교한다면 형질전환체의 스트레스 반응과 중금속 내성 사이의 연관성 여부를 확인 할 수 있는 지표가 될 것으로 기대한다.

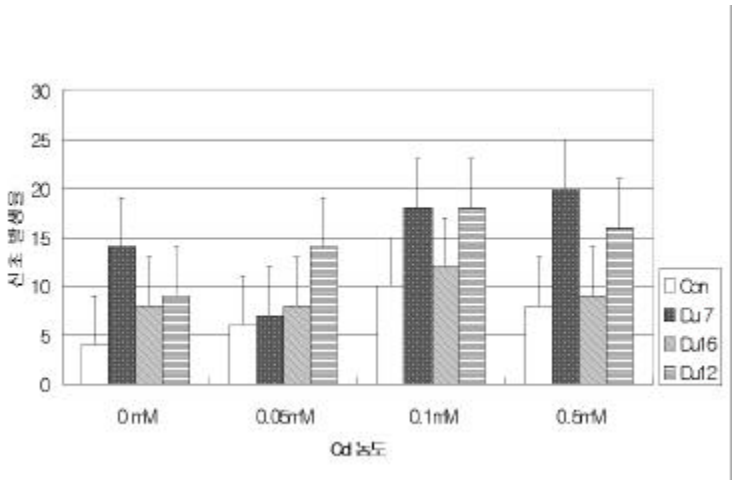


Fig 17. 수경재배 배양액에 CdCl2 첨가에 의한 신초 발생율

Control plant Transgenic plant

Fig 18. 수경재배 배양액에 0.1mM CdCl2 첨가시 신초 발생

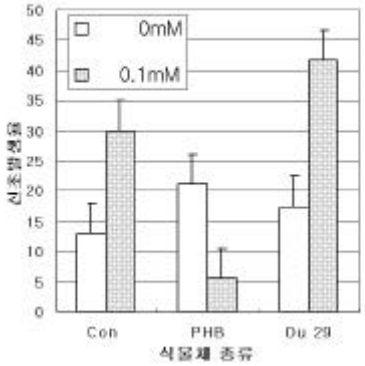
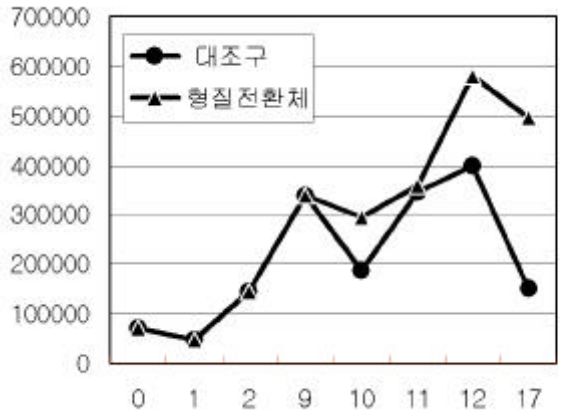


Fig 19. **수경재배 배양액에** CdCl2 **첨가에 의한 신초 발생율 비교(배양액** pH5.5)

A



B

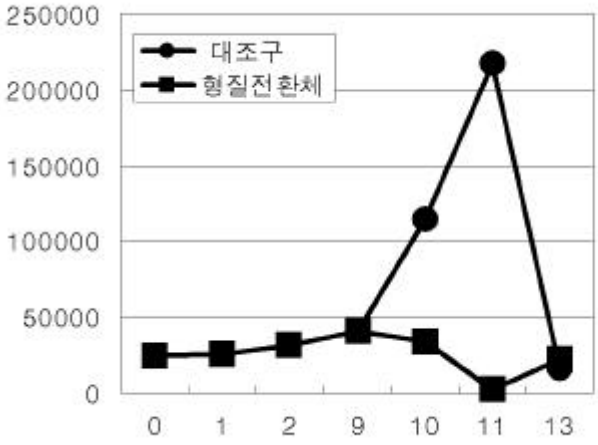


Fig. 20 polyamine **함량 변화**

A : putresine B: spermidine

第 4 節 結 論

1. 중금속 결합 단백질 유전자의 분리 및 벡터 개발

중금속 결합 단백질을 이용하여 식물발현용 벡터를 완성한 예는 metallothionein 유전자를 1989년 Misra 등에 의해 담배에서 형질전환된 예가 보고된바 있다. 그러나 ferritin 유전자의 경우는 단백질의 특성 등에 관해 보고되었을 뿐 cloning에 관하여서는 보고된 바 없다. 따라서 본 실험에서 ferritin 유전자를 cloning하여 식물 형질전환용 vector를 완성한 것은 상당한 의미를 가지는 것으로 판단되며 중금속 제거 수목의 육성에도 아주 큰 역할을 할 것으로 생각된다.

2. 형질전환 줄기 유도 및 증식

식물형질 전환은 본 실험실에서 사용하고 있는 일반적인 방법으로 실시하였다. 그 결과 식물형질전환율과 줄기유도율은 큰 문제가 없었다. 발근 배지에서의 발근율 또한 양호하였으며 기외 발근 또한 가능하였다. 현재 대부분의 식물체가 포지에 이식되었다.

3. 유전자 삽입 및 발현 확인

npt II 분석, genomic PCR, 및 RT-PCR방법으로 식물체내에 유전자 삽입 및 발현을 확인한 결과 정상적으로 삽입되고 발현됨을 확인하였다. 그러나 삽입된 유전자의 copy수는 정확히 알 수 없었으며 dot blot 결과로써 promoter간의 유전자 발현 정도의 차이를 발견할 수 없었다. ELISA에 의한 *npt* II 분석 등 의 결과로 미루어 볼 때 삽입된 유전자의 발현은 단백질 수준까지는 매우 안정적으로 생각되나 ferritin 및 MT의 antibody의 부재로 이에 대한 검정을 할 수 없었다. 상동성이 70% 되는 human ferritin antibody를 이용한 western 반응은 부정적으로 나타났다. 이렇게 동물의 유전자를 식물에 이식시키는데 따르는 몇 가지 문제점으로 생각되는 유전자 발현 장소(세포질, 엽록체, 미토콘드리아 등)와 그에 따른 유전자 산물인 효소 혹은 단

백질의 pH 적정치나 외부 단백질에 대한 선택적인 분해 등은 앞으로 해결해야 할 것으로 생각된다.

4. 내성검정

포지 식물체를 수경재배법으로 줄기 발생율을 검정한 결과 형질전환체는 신초 발생율에 차이가 있었다. 그러나 0.1mM 농도에서는 control plant 또한 중금속을 처리하지 않은 배지에서 보다 높은 신초 발생율을 보이는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 pH를 5.5로 고정한 후 0.1mM의 중금속을 처리하였을때도 같은 반응이 관찰되었다. 이것은 2가의 금속이온들이 어느 정도의 농도까지는 식물생육에 도움을 주기 때문인 것으로 생각되었다.

한편 ICP로 중금속 함유량을 분석한 결과로 형질전환체는 고사하지 않으면서 control 식물체보다 높은 중금속 함유량을 가진 것으로 보아 중금속 결합 단백질을 coding하는 유전자들이 단백질 수준에서 안정적으로 발현되고 있는 것으로 추측되었다.

또한 polyamine 분석 결과는 control plant는 putresecine보다 spermidine변이에 더 많은 변이를 보이는 것이 관찰되었다. Polyamine 분석결과 형질전환체 보다 control plant가 polyamine 변화가 더 심한 것은 $CdCl_2$ 처리가 control plant에 더 민감하게 작용했기 때문으로 생각된다.

본 연구에서는 또한 최초로 형질전환체의 내성을 탐지하기 위한 시험관적 기법인 cell culture를 이용한 fresh weight 증감, Evans blue, MTT 등 생화학적 기법을 적용하였다. 비록 시간적인 제약으로 완벽한 조건은 확립하지 못하였으나 각각 세포생장, 원형질막 손상 여부 미토콘드리아의 활력 검정 등은 앞으로 이런 종류의 실험에 아주 유익하게 이용될 것으로 예상된다.

5. 오염지 적응

Fe^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}등 화학적으로 비분해성 물질인 2가의 중금속을 결합한 후 식물체내에 축적시킬 수 있는 중금속 흡수 수종을 개발함으로써 공단지역 등의 토

양오염을 해결할 수 있을 것으로 전망된다. 또한 식물을 통한 오염물질의 제거는 환경친화적 이고 가장 비용저렴한 방법이므로 물리적 화학적 처리에 의한 고비용의 절감 효과를 가져올 수 있을 것으로 판단된다.

그러나 이러한 결과를 실제로 적용하가 전에 몇 가지 해결해야할 문제가 있다. 형질전환체를 오염지에 적응시키기 위하여 탄광촌을 비롯한 오염지 몇 군데를 시찰하였는데 탄광촌의 경우는 굴착된 흙으로 덮여 있기 때문에 중금속도 문제이겠지만 그것보다도 복사열과 수분부족으로 인한 식물체가 정착할 수 없는 환경을 만들어 내고 있었다. 2가의 중금속에 어느 정도 견디고 흡수량이 일반 식물체 보다 많다 하더라도 그러한 환경에서 적응하여 살아 남기에는 역부족일 것으로 생각된다. 그러므로 수분 스트레스, 고온 스트레스에 견디는 유전자 등 여러 가지 복합적인 유전자 조작 작업이 필요하다고 생각된다. 또한 대부분 오염은 여러 가지 스트레스를 동반하고 있기 때문에 스트레스 해독 유전자인 Nir, GR, SOD 등도 함께 연구하여야 할 필요가 있는 것으로 생각된다.

또한 이 모든 오염에 대한 내성은 궁극적으로 식물이 스트레스에 대해 반응하는 기작과 연관이 있다. 그러므로 식물과 스트레스에 대한 복합적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

參考文獻

1. Baker, A.J.M. and R.R. Brooks. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements- a review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1:81-126.
2. Baker, A.J.M. *et al.* 1994. The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. Res. Conserv. and Recycl. 11:41-49.
3. Boyajian G. E. and Carreira L. H. 1997. Phytoremediation: a clean transition from laboratory. Nature Biotechnol. 15:127
4. Brown S. L. *et al.* 1995. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils. Environ. Sci. Technol. 29:1581-1585.
5. Chun, Y. W. *et al.* 1988. Transformation of *Populus* species by an *Agrobacterium* binary vector system. J. Kor. For. Soc. 77:199-207.
6. Chun, Y. W. and N. B. Klopfenstein. 1995. Organ specific expression of the nos-NPT II gene in transgenic hybrid poplar. J. Kor. For. Soc. 84 : 77-86.
7. Chun, Y. W. 1994. Application of *Agrobacterium* vector systems for transformation in lus species. In: Zin-Suh Kim and Hans H. Hattemer (eds.). Conservation and Manipulation of Genetics Resources in Forestry. Kwang Moon Kag, Seoul, 1994. pp 206-218.
8. Cox R. M. 1988. The sensitivity of pollen from various coniferous and broad-leaved trees to combinations of acidity and trace metals. New Phytol., 109:193-201
9. Cunningham, S. D. and D. W. Ow. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. Plant Physiol 110:715-719.

10. Cunningham, S. D. and W. R. Berti. 1993. Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. In Vitro Cell Dev. Biol. 29:207-212.

11. Cunningham, S. D. *et al.* 1995. Phytoremediation of contaminated soils. Trends Biotechnol. 13:393-397.

12. Cunningham, S. D. *et al.* 1995. Remediation of contaminated soils and sludges by green plants. In: Hinchee RE, Means JL, Burris DR, eds. Bioremediation of Inorganics. Battelle Press, p 33-54.

13. Cunningham, S.D et al. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. Advance in Agronomy 56:55-114.

14. Chnningham S. D., Berti W. R. 1993. Phytoremediation of contaminated soils: progress and promise. Symposium on Bioremediation and Bioprocessing presented before the division of petrloeum

15. Chemistry and Fules Chemistry American Chemical Soceity, Denver Meeting, March 28-April 2.

16. De Block, M. 1990. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tume/aciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. Plant Physiol 93: 1110-1116.

17. Illatti, J. J. et al. 1987. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of Populus. Mol Gen Genet 206: 192-199.

18. Grill, E. et al. 1985. Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. Science 230:674-676.

19. Hentschel E., Godbold D. L., Marschner P., Schlegel H. and Jentschke G. 1993. The effect of *paxillus involutus* fr. on aluminum sensitivity of norway spruce seedlings. Tree Physiology 12:379-390

20. Hong S., Candelone J. P., Patterson C. C. and Boutron C. F. 1996. History of ancient copper smelting pollution during roman and medieval times

recorded in greenland ice. Science 272:246-249

21. Howe, G. T. et al. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants. Planr Cell, Tissue and Organ Culture 36: 59-71.
22. Huang, J. W. and S. D. Cunningham. 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. New Phytol 134:75-84.
23. Huang J.W., Chen J., Berti W. R.and Cunningham S. D. 1996. Phytoremediation of lead contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction.
24. Jackson, P. J. et al. 1993. Accumulation of toxic metal ions on cell walls of Datura innoxia suspension cell cultures. In Vitro Cell Dev Biol 29P:220-226.
25. Jefferson, R. A. et al. 1987. GUS fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal 6(13): 3901-3907.
26. Macnair, M. R. 1987. Heavy metal tolerance in plants: a model evolutionary system. Tree 2: 354-359.
27. McCormick L. H. and Steiner K. C. 1978. Variation in aluminum tolerance among six genera of trees. Forest Sci. 24:565-568
28. Misra S and Gedamu L. 1990 Heavy metal resistance in transgenic plants expressing a human metallothionein gene. plant gene transfer 257-265
29. Muir P. S. and McCune B. 1988. Lichens, tree growth, and foliar symptoms of air pollution: are the stories consistent?. J. Environ. Qual., 17:361-370
30. Nutter W. L. and Red J. T. 1986. Future directions: forest wastewater application. In: DW Cole, CL. Henry and WL. Nutter(eds.) The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes. univ. of washington press.

31. Nyer E. K. and Gatliff E. G. 1996. Phytoremediation. Winter GWMR pp 58-61

32. Ow, D. W. 1993. Phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. In Vitro Cell Dev Biol 29P:213-219.

33. Raskin I. 1996. Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3164-3166

34. Salt D. E. et al. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Bio/Technology 13:468-474.

35. Schaedle M., Thornton F. C., Raynal D. J. and Tepper H. B. 1989. Reponse of tree seedlings to aluminum. Tree Physiology 5:337-356

36. Stomp, A.M. et al. 1993. Genetic improvement of tree species for remediation of hazardous wastes. In Vitro Cell Dev Biol 29P:227-232.

37. Tzfira, T. et al. 1997. Transformation and regeneration of transgenic aspen plants via shoot formation from stem explants. Physiologia Plantarum 99:554-561.

제 3 장 NO2 동화경로 관여 유전자 도입에 의한 대기오염 정화 포플러의 육종

전북대학교 유전공학연구소

연구책임자 : 양 문 식

연 구 원 : 권 태 호

연 구 원 : 김 태 금

연 구 원 : 김 효 분

第 1 節 緖 設

대기오염에 의한 식물에의 영향은 산업활동과 연료소비형태의 변화와 함께 변화하여 왔다. 일반적으로 광산, 제련공장 주변의 수목이 고사하거나 화력발전소나 석유화학공장주변의 수목에서 불임현상이 생기며 수도에 있어서는 농작물의 수량이 감소하였다. 현재 자동차등을 발생원으로 하는 도시형 대기오염이 광역적으로 농작물에 피해를 입히고 수목의 낙엽현상 및 생장의 억제를 시킬 뿐만 아니라 인간에게도 암을 유발하는 등 커다란 위험으로 작용하고 있다. . 이러한 대기오염물질에 의하여 피해가 발생하는 과정은 식물에 의한 오염물질(O_3, NO_2, SO_2)의 흡수, 세포 내에서 화학반응에 의한 독물질의 생성, 표적물질과의 반응, 효소활성의 실활과 생체막, 클로로필의 파괴, 성장저해와 세포의 괴사, 식물의 노화촉진과 낙엽 및 고사에 이른다 (Omasa *et al*. 1983). 이러한 어떤 단계에서도 대기오염물질 각각에 특징적인 반응이 있으리라 생각되어지나 장해발현의 후기과정에 있어서는 오염물질의 종류에 관계없이 활성효소가 관여하고 있다. 이러한 장해에 대하여 식물은 오염물질의 흡수속도의 조절, 독물의 해독, 장해의 수복 등의 기능을 갖고있어 대기오염물질에 대하여 내성을 나타낸다.

이러한 대기오염 물질 중에서 가장 심각한 것은 NO_2가스로 각종 질병을 유발할 뿐만 아니라 식물에도 심각한 위해를 가한다. 식물은 대기중의 NO_2가스를 기공을 통하여 식물 세포 내에 흡수하고 세포내의 H_2O와 반응하여 NO_3^-와 NO_2^-가 1:1로 생성되며 H^+가 생성된다. 생성되어진 NO_3^-이온은 nitrate reductase(NR)에 의하여 NO_2^-이온으로 환원되어 엽록체 안으로 전류되고 nitrite reductase(NiR)에 의하여 NH_4^+로 환원되어진다. 이렇게 생긴 NH_4^+는 GS 및 GOGAT에 의하여 글루타민 산으로 되고 이렇게 생긴 글루타민산은 여러 아미노산 합성효소에 의하여 다른 아미노산이 되고 최종적으로 단백질로 동화되어 진다(그림1, Yoneyama *et al*., 1978). 그러나 일반적으로 식물을 고농도의 NO_2에 접촉시키면 생리적 장해를 일으키며 특히 SO_2와 O_3과

같은 다른 대기오염물질과 동시에 접촉되어지면 저농도의 NO_2에서도 현저한 장해를 발생한다. 식물의 NO_2^-는 통상 세포 내에 1㎛M정도의 낮은 농도로 유지되고 있으나 고농도의 NO_2에서는 NR에 의하여 NO_3^-로 부터 환원되어진 NO_2^-가 세포질에 축적되어 독성으로 작용하여 carbonic anhydrase활성을 저해하며, 이 효소의 활성 저하에 의하여 CO_2의 탄산 고정계에의 공급이 억제되어지고 광합성속도가 저하되어 생육에 장해를 가져오게 된다(Yoneyama and Sasakawa 1979; Yoneyama *et al.*, 1979) 이에 대하여 식물은 축적되어진 NO_2^-이온을 NiR에 의하여 NH_4^+로 환원시키고 GS, GOGAT등의 효소에 의하여 무독성의 아미노산으로 동화시키는 방어 메커니즘을 갖고 있다. 그러나 NiR 유전자의 발현은 생물시계의 제어 하에 있고 이들의 효소의 발현은 야간에 저하한다. 따라서 식물에 유해한 NO_2^-이온이 축적되어지고 이로 인하여 식물은 해를 입게된다(Ashenden *et al.*, 1978; Takeuchi *et al.*, 1985).

따라서 본 연구는 NiR의 유전자를 cloning하고, NiR 유전자를 식물 세포 내에서 항시 발현 할 수 있도록 유전자를 조작하여 이를 식물에 도입함으로서 NO_2^-의 대사 능력을 높여, 대기오염에 강한 식물의 육성을 하고자 실시하였다.

第 2 節 材料 및 方法

본 연구에서는 NO2 동화경로의 관여 효소 중 NiR 유전자의 발현수준을 인위적으로 조절할 수 있도록 재조합 되어진 유전자를 포플러에 도입, 발현시켜 대기오염물질을 정화시킬 수 있는 식물을 육성하고자 한다. 위와 같은 목적을 달성하기 위하여 사용하는 방법은 아래와 같다.

1. NiR 유전자의 cloning

Polymerase chain reaction(PCR)은 이미 염기서열이 밝혀진 유전자를 cloning하는데 매우 유용한 기술이다. 본 연구에서는 암 상태에서 키운 *Spinacia oleracea*의 잎으로부터 RNA를 분리한 후 이미 알려진 cDNA(Shiraish *et al.*, 1991)의 염기배열을 기본으로 하여 computer program을 이용하여 transcription initiation site를 포함하는 5' primer(5'-GGA ATT CCA TCA GAT TAA CAT AAT TTC ACA AT-3')와 polyadenylation signal을 포함하는 3' primer(5'-GTA ATA TAA TTC TAA CAA TTA-3')를 합성하였고, reverse transcriptase를 이용한 RT-PCR을 실시하였다. PCR반응에 의해 특이적으로 증폭된 DNA를 agarose gel에서 분리 획득하여 kinase와 klenow enzyme을 처리한 후 plasmid vector(pGEM-T)에 blunt-end ligation을 하여 cloning하였다.

2. 유전자의 특성화

유전자의 특성화를 위해 pGEM-T vector에 subcloning한 NiR 유전자의 염기서열을 dideoxynucleotide chain termination 방법(Sanger and Nicklen, 1977)으로 결정하였다. 염기서열 결정의 효율을 높이기 위해 획득한 clone을 unidirectional deletion 방법(Henikoff, 1984)으로 처리하여 적절한 크기의 단축 clone들을 획득,

sequencing에 사용하였다. 확인된 NiR DNA를 식물에서 발현할 수 있도록 재조합 하였다.

3. NiR 유전자의 식물체내의 도입을 위한 재조합 유전자 제조

특성화된 *Spinacia oleracea*의 NiR 유전자를 식물로의 도입 및 발현시키기 위해 식물발현용 유전자 운반체(Agrobacterium의 Ti-plasmid에서 유도된 운반체 pMY27)와 재조합을 하였다. 도입 유전자의 발현을 결정하는 5'-조절인자는 식물 virus인 cauliflower mosaic virus(CaMV)에서 유도된 항시성 promoter인 35S promoter(Sanders *et al.*, 1987)와 이것에 enhancer부위를 부착한 duplicate 35S promoter(Kang *et al.*, 1987)를 사용하였으며. 이 재조합 운반체는 형질전환 세포의 선발을 위해 bacteria의 neomycin phosphotransferase II (NPT II)를 함유하고 있어 항생물질에 의해 형질전환 세포를 선발하였다.

4. 식물로의 형질전환 및 재분화

가. 담배의 형질전환

TPS의 유전자를 포함하는 *A. tumefaciens* LBA4404를 기내에서 무균적으로 생육하고 있는 담배의 잎과 공동배양을 한 후에 NAA 0.1 mg/L, BA 1.0 mg/L, Km 100mg/L를 첨가한 배지에서 배양하였다. 유도된 카나마이신 저항성 신초로부터의 발근은 식물생장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지에 계대배양하여 유도하였다.

나. 포플러의 형질전환

형질전환과 증식이 용이하며 환경 적응력이 강한 수원포플러를 공시재료로 하여 사용하였다. 먼저 성숙목의 가지를 채취하여 온실에서 눈을 띄워 액아를 유도한 후 액아절편체를 자른 후에, 표면소독을 하였다. 소독은 70% ethylalcohol로 30초간 침지한 후, 2% sodium hypochlorite로 10분간 침지하고 3회 이상 멸균수로 세척한 후

각 절편체를 액아가 하나씩 붙도록 조제하여 0.5mg/L BAP가 첨가된 MS(Murashige and Skoog 1962)배지에 치상하였다. 배양조건은 25±2℃의 온도와 약 2,000 lux의 광도로 16시간의 일장으로 배양하고 형질전환을 위한 충분한 식물 재료로 사용하기 위하여 얻어진 기내줄기를 0.2mg/L BAP가 첨가된 MS배지가 30ml 가 들어있는 배양병에 매 4주마다 계대배양 하였다. 기내에서 생장중인 엽병과 절간 조직을 형질전환 재료로 이용하였으며, 엽병을 길이 5mm로 잎으로부터 분리하고, 절간조직은 길이 5-10mm내외로 잘라 재조합 유전자를 포함하는 *A. tumefaciens* 균주를 접종한 후 캘러스 형성이 용이하도록 메스로 잘게 상처를 준다. 준비된 엽병 및 절간조직 절편체를 acetosyringone100μM 이 첨가된 LB배지에서 overnight 배양하여 키운 *A. tumefaciens* LBA4404과 함께 30분 내지 12시간 co-culture한 후 멸균된 여과지에 놓아 과잉의 박테리아 액을 닦아내고 생장조절물질이 들어있지 않은 MS 배지에 25℃의 조건에서 2-4일간 암소에서 배양하였다. 공조배양 후, 절편체를 cefotaxcime 500mg/L가 첨가된 0.85% 생리식염수로 세척하고 cefotaxcime 500mg/L와 Kanamycin 50mg/L이 첨가된 캘러스 유도배지 (CIM; Callus Induction Medium; MS + 2,4-D 1mg/L + BAP 0,1mg/L)에서 2주간 암배양을 하였다. 그후 cefotaxcime 500mg/L와 kanamycin 500mg/L이 첨가된 재분화배지 (MS + zeatin 1mg/L + BAP 0.1mg/L)에 2주마다 계대배양 하였으며, 이때의 배양조건은 25±2℃의 온도와 약2,000 lux의 광도로 16시간의 일장으로 처리하였다. 캘러스로 부터 재분화된 줄기는 발근 배지 (MS + IBA 0.2mg/L)에서 뿌리를 형성시킨 후, 온실에서 포트묘로 육성하였다.

5. 재분화 식물체의 분석

Antibiotics에 내성을 가지는 재분화 식물에서 얻은 DNA를 여러 제한효소로 자른 절편과 도입유전자의 특이적 부분을 방사성 동위원소로 표지한 probe간의 DNA-DNA hybridization을 이용한 Southern-blot analysis를 실시하였으며, 또한 식물 조직에서 mRNA를 분리한 후 Northern-blot analysis를 통해 재조합 유전자의

전사여부와 도입유전자의 발현정도를 확인하였다.

6. 형질전환 식물체의 NiR 효소활성

선발되어진 형질전환체의 NO_2^-의 분해능력을 조사하기 위하여 유전자 도입이 확인된 형질전환체의 종자를 MS 배지(모든 질소원을 제거 한 후에 KNO_3를 농도별로 처리)에서 발아 2주 후 연속광 또는 암조건에서 2일간 배양하였다. 2주 후 담배의 잎을 이용하여 NiR 효소활성을 조사하였으며, NiR 효소활성은 Schuster(1987)의 방법에 준하여 실시하였다. 효소활성 분석 결과 NiR 효소활성이 높은 개체를 선발하여 증식하고 순화시켰다.

第 3 節 結果 및 考察

1. NiR 유전자의 cloning

NiR 유전자를 분리하기 위하여 본 연구에서는 암 상태에서 키운 *Spinacia oleracea*의 잎으로부터 DNA와 RNA를 분리한 후 이미 알려진 cDNA(Shiraish et al., 1991)의 염기배열을 기본으로 하여 5‘ primer (5'-GGA ATT CCA TCA GAT TAA CAT AAT TTC ACA AT-3')와 3’ primer(5'-GTA ATA TAA TTC TAA CAA TTA-3')를 합성하였다. 이 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 시금치의 전체 DNA에서 NiR의 ORF를 포함하는 3.0kb의 1.7kb NiR의 유전자를 확보하였으며(**Figure 1**), PCR 반응에 의해 특이적으로 증폭된 3.0kb의 DNA 단편을 pGEM-T vector에 cloning 하였다(**Figure 2**).

2. NiR 유전자의 특성화

유전자의 특성화를 위해 cloning한 유전자의 염기서열을 dideoxynucleotide chain termination방법(Sanger and Nicklen, 1977)으로 결정하였다. 특히 NiR 유전자에서 염기서열 결정의 효율을 높이기 위해, 획득한 clone을 unidirectional detection 방법(Henikoff, 1984)으로 처리하여 적절한 크기의 단축 clone들을 획득, sequencing에 사용하였으며, 또한 한번의 실험결과 더 많은 DNA 염기서열을 읽을 수 있는 automatic DNA sequencer를 이용하여 manual sequencing의 결과와 비교 확인하였다. 이로부터 얻어진 NiR 유전자가 이미 보고된 유전자의 염기서열과 일치함을 확인하였다(**Figure 3**).

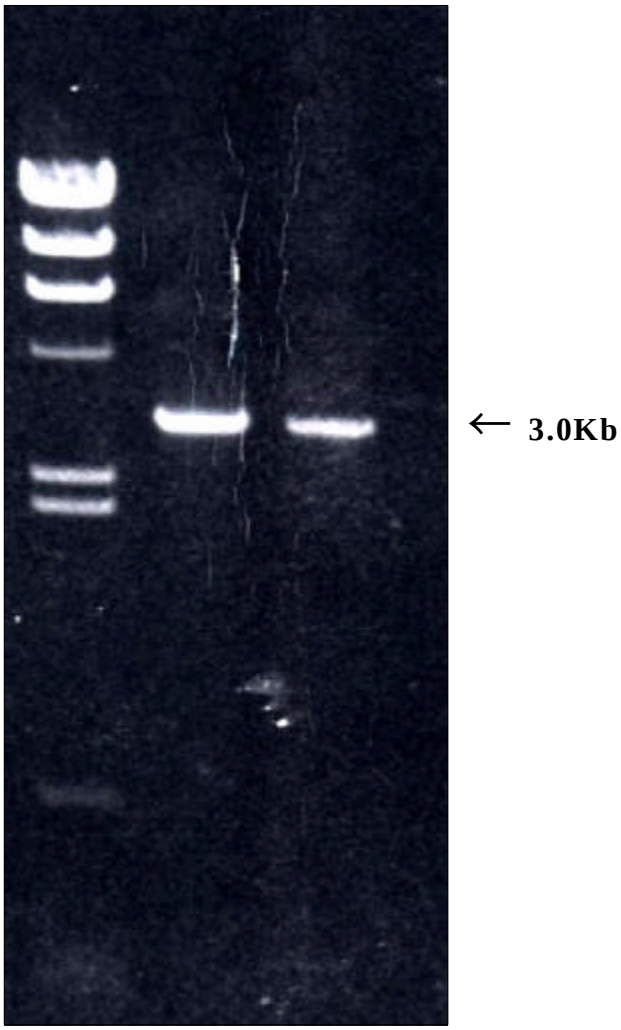


Figure 1. Agarose gel electrophresis of PCR products of *Spinacia oleracea* NiR gene with NiR-F and NiR-R primers.

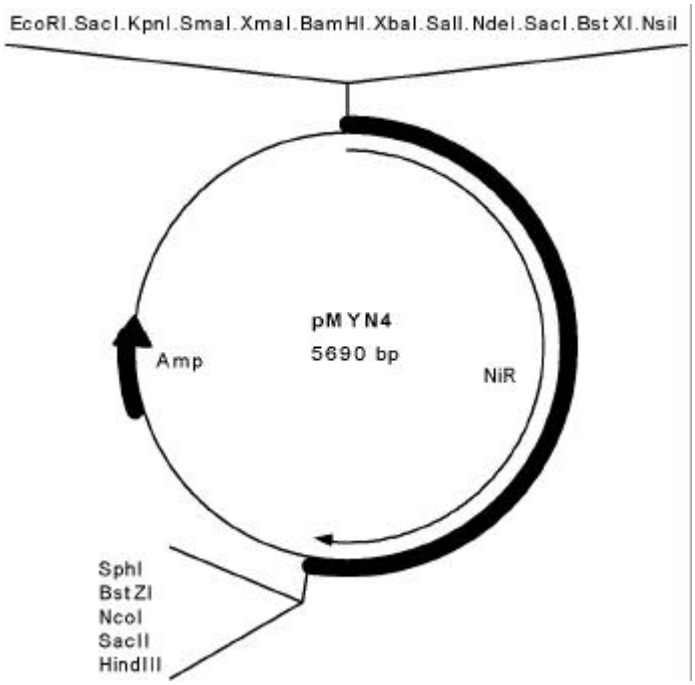


Figure 2. Schematic diagrams of pMYN4. DNA fragment of 3.0Kb containing the coding region of the of *Spinacia oleracea* NiR gene.

```
          10          20          30          40          50          60
CTCACCGTTT GTCCTTCTCC TCTTTCTCTC TCCTCAATCA CCCTACATAA AAATACAATT
          70          80          90         100         110         120
TCAATTCCAC CACTAACTCA TCATCATCAT CATCATCTTC ATCTTCATCT TCATCATTCA
         130         140         150         160         170         180
TAGTTCCAAG AAACAGAGCA ACCAAAAAAA ATCGCATCAC TTCCAGTCAA CAAGATCATA
         190         200         210         220         230         240
CCATCATCAA CGACATTACT GTCATCGTCG AACAACAACA GAACAAGAAA TAACTCATCA
         250         260         270         280         290         300
ATTCGATGCC AGAAGGCGGT TTCACCCCCG GCAGAAACCG CTGCAGTGTC GCCGTCTGTG
         310         320         330         340         350         360
GACGCCGCGA CGCTGGAGCC GAGAGTGGAG GACAGAGATG GGTTTTGGGT ATTGAAGGAG
         370         380         390         400         410         420
GAATTTAGGA CTGGGATTAA CCCAGCTCAG AAAGTTAACA TTGAGAAAGA CCCAATGAAG
         430         440         450         460         470         480
TTGTTTATTG AGGATGCGAT TAGTGATCTT GCTACTTTCT CAATGGAGGA AGTTGATAAA
         490         500         510         520         530         540
TCTAACCATA ATAAGGATGA TATTGATCTT AGACTCAACT GGCTTGGACT TTTCCATCGC
         550         560         570         580         590         600
CGTAAACATC ACTGTAAGCT TAACTAACTT CCTAATTGTT GTTCTATAAT TCGATTTTTT
         610         620         630         640         650         660
TTTAAAAGAT TAGATGATTA ATTAGATCCA TTTTTATGAT TGGTTTTGAT TCAATTTAAG
         670         680         690         700         710         720
AGGTTAATTG CTTGATTAGG ACATATTTTC TGTTGGTTAG TCAACGAATT TCATGTCGCA
         730         740         750         760         770         780
ATCGCTTAAA AGGGATCTTG TTACTATAAT CGTACGTAAT TAGCTTGTTA ATTTAATCAT
```

790 800 810 820 830 840

TGAATATGGT TTTTATATCG TTTTGCTCAA AATTCGAAAC CCACAAATCG GATTGAATAT

850 860 870 880 890 900

TGATGATTGA CGAATATGGT TAGAAGAAGT TATAGTTGAA ATTCTAATTA GCTTAGTAAT

910 920 930 940 950 960

TGGATCATTT CATTAAATTT GAAATCCCGG AATCGGACTG AATATGGAGG AATTCCGTAG

970 980 990 1000 1010 1020

TAAAACTGTA GCTACTCGAC TCAGTAGAAA TGAATTGTCA GTATGATTGA TGGATAATGT

1030 1040 1050 1060 1070 1080

TAAATCTTTA TGTAATCGAG TCAGTCTCAT GGATGACTCT AAAAAATGGT GGATGTTATT

1090 1100 1110 1120 1130 1140

AGATGCGAGA TTCATGATGA GCTTGAACCT GCCGAATGCG GTAACAACGA GTGAGCAGAC

1150 1160 1170 1180 1190 1200

ACGGTACCTA GCAAGCCTGA TCAAGAACTA CGCAAAAGAT GGATGTGCGG ATGTAACAAC

1210 1220 1230 1240 1250 1260

AAGGCAAAAC TGGCAAATTA GAGGAGTTGT TCTGCCTGAT GTGCCAGAGA TCATCAAAGG

1270 1280 1290 1300 1310 1320

GCTGGAATCC CTTGGTCTTA CCAGCTTACA GACTGGGATG GACAATGTAA GGAACCCTGT

1330 1340 1350 1360 1370 1380

AGGTAACCCT CTTGCACGGA TTGACCCTCA TGAAATTGTT GACACCCGAC CTTTTACCAA

1390 1400 1410 1420 1430 1440

CCTAATTTCC CAATTTCTCA CTGCCAATTC GCCTGGAAAC CTTTCTATTA CCAATCTGTA

1450 1460 1470 1480 1490 1500

AGTCCTTTCG CTATCTCTTT CAAGCATCTT ATCGTAAATC TGTATTAGTA ACTTGTTAGG

1510 1520 1530 1540 1550 1560

CGCTGTTGTT TGTTTTCAAC ATTGGTTCAG GCCAAGGAAG TGGAATCCAT GTGTTATTGG

1570 1580 1590 1600 1610 1620

GTCCCATGAT CTTTATCAGC ATCCACACAT CAATGACCTT GCTTACATGC CTGCTACAAA

1630 1640 1650 1660 1670 1680

GAATGCGAAA TTCGGGTTTA ATTTGTTCGT TGCAGGATTC TTTAGCATCA AAAGATGTGA

1690 1700 1710 1720 1730 1740

AGAGGCAATC CCACTACACG CTTGGGTCTC AGCAGAAGAT GTGCTTCCTG TATGCAAAGC

1750 1760 1770 1780 1790 1800

TATGCTTGAA GCTTTCAGGG ACCTTGGCTT TACAGGAAAC AGGCAGAAGT GCAGAATGAT

1810 1820 1830 1840 1850 1860

GTGGCTTATT CATGAGCTTG TCAGTACTAC TAACAAACAA CTCTCCTCTT ACTAGTTAAT

1870 1880 1890 1900 1910 1920

CTATTCTAAG TAATTATTCT AACTGTATTG CTCATTCTCC AAACAATGGC AGGGTATGGA

1930 1940 1950 1960 1970 1980

AGCATTCAGG CGAGAGGTTG ACAAGAGAAT GCCTGAGCAA GTTCTAGAAA GAGCATCCTC

1990 2000 2010 2020 2030 2040

AGAAGAGCTG CTTCAGAAGG ACTGGGACAG AACAGAATAC TTACGAGTTC ACCCTCAGAA

2050 2060 2070 2080 2090 2100

ACAACAAGGA CTTAGCTTTG TCGGTCTCCA CATTCCTGTG GGCCGTCTGC AAGCTGATGA

2110 2120 2130 2140 2150 2160

GATGGAAGAG TTAGCCCGTA TAGCTGATGT GTATGGATCA GGGCAGCTCC GTCTGACAGT

2170 2180 2190 2200 2210 2220

AGAGCAGAAC ATAATCATCC CAAATGTTGA AAACTCAAAG ATACATTCAC TACTAAACGA

2230 2240 2250 2260 2270 2280

GCCTCTGTTA AAAGAGCGTT ACTCCCCTGA ACCACCCATC TTGATGAAGG GGCTTGTGGC

2290 2300 2310 2320 2330 2340

CTGTACGGGG AGCCAATTTT GTGGACAAGC CATTATCGAG ACCAAGGCTA GGGCACTCAA

```
      2350        2360        2370        2380        2390        2400
GGTGACAGAA CAGGTACAAC GACTAGTCTC TGTAACACCG CCTCTTAGGA TGCATTGGAC
      2410        2420        2430        2440        2450        2460
CGGGTCTCCT AATAGTTGTG GTCAAGTACA AGTGGCTGAT ATTCGGTTCA TGGGTTGCAT
      2470        2480        2490        2500        2510        2520
GACTACGGAT CAGAACCGTA ACCCTTGTGA AGCAGCTGAT GTGTTTGTAG GAGGACGTAT
      2530        2540        2550        2560        2570        2580
AGGAACTGAC TCGCATCTAG GAGACATTTA CAAGAAGGCA GTCCCATGTA AAGATTTGGT
      2590        2600        2610        2620        2630        2640
GCCTGTTGTT CCTGAGATAT TCATCAACCA ATTCGGTGCT GTTCCTAGGG AGAGGGAAGA
      2650        2660        2670        2680        2690        2700
GGCAGAGTAG TAGCTACACT GTTTTGGCTG CCTGTTCTTG TTAACTGTTA TCGGTATTCG
      2710        2720        2730        2740        2750        2760
GTAATTACTT CTAATATTTG CATTTTTTTT CAAGCATATA ATTAAATTGC ATAAAGATCC
      2770        2780        2790        2800        2810        2820
CTTGTATGTC TGCATAACAA GATACTCAGT TATGTAATCT CAATAGCAGG TTTACTTTGT
      2830        2840        2850        2860        2870        2880
TTATTCAATA CGCACTCTGA AAGGGAAAGT TCATTATTCA TTTCTCACAA TGTTTCCAAT
      2890        2900        2910        2920        2930        2940
TTGAGATCGA AAAAATATAT ATAATATTGT CTACATCATT TACCGTATTG GAACGTTCGC
      2950        2960        2970        2980        2990        3000
TACAGAAAAA AAGAAACTTG ACTTGATCAT TTCTTATCAT ATCTAAATTT CAACATATCG
      3010        3020        3030        3040        3050        3060
CTATCTGTCT TCGAAACTAA ACATGCGAAA CCATCAGCAG AGACGCAATT CAGGCAAACC
      3070        3080        3090        3100        3110        3120
AGCATTCAAG AAG..... .......... .......... .......... ..........
```

Figure 3. The nucleotide sequence of *Spinacia oleracea* NiR gene.

3. NiR 유전자의 식물체내 도입을 위한 재조합 유전자의 제조

특성화된 NiR 유전자를 식물로의 도입 및 발현시키기 위해 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid에서 유도된 식물발현용 유전자 운반체와 재조합을 하였다(**Figure 4**). 도입 유전자의 발현을 결정하는 5'-조절인자는 식
물 virus인 cauliflower mosaic virus(CaMV)에서 유도된 항시성 promoter인 35S promoter(Sanders et al., 1987)를 이용하였다. 또 이 재조합 운반체를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 담배와 poplar에 형질전환 시키기 위하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환 시켰다

4. NiR 유전자의 도입

가. 담배로의 NiR 유전자의 도입

본 연구는 NO_2 분해능력이 뛰어난 포플러를 육성함에 목적을 두고 있으나, 오염지에서의 NO_2 분해능력의 향상을 통한 정화능력의 확인에 필요한 포플러의 유성 및 적정 생육까지에는 시간이 요하므로, NiR유전자가 형질전환된 식물체의 저항성 여부를 보다 빠른 시간에 확인하기 위하여 기존의 연구계획에 추가하여 생육이 빠른 담배에 형질전환 하였다. NiR 유전자를 포함하는 *A. tumefaciens* LBA4404를 기내 발아 후 4주된 담배의 엽과 공동배양을 한 후에 NAA 0.05 mg/L, BA 1.0 mg/L, Km 100mg/L를 첨가한 배지에서 카나마이신 저항성 식물체 5개체를 선발하였고, *Spinacia oleracea* NiR gene에 특이적인 primer를 이용하여 *Spinacia oleracea* NiR gene ORF중 500bpdp 해당하는 DNA의 증폭을 확인함으로서 *Spinacia oleracea* NiR gene 유전자의 도입을 확인하였다(**Figure 5**).

나. 포플러로의 NiR 유전자의 도입

(1) 공조배양

유전자 이식을 위해 NiR 유전자가 들어있는 아그로박테리움 pMYN6와 기내 절간조직, 엽병 등의 절편체와의 공조배양은 10 15분간으로 충분하였다. 감염 후에는

0.85% 생리식염수로 씻어내어 아그로박테리아가 과도히 자라는 것을 방지하였다. 감염된 절편체는 MS 기본배지에 이식하여 2일간 암흑 배양한 다음 가나마이신이 첨가된 캘러스 유도 배지로 계대배양 하였다. 캘러스 유도는 MS+2.4-D 0.5 1.0, NAA 0.01㎎/ℓ 배지를 사용했다.

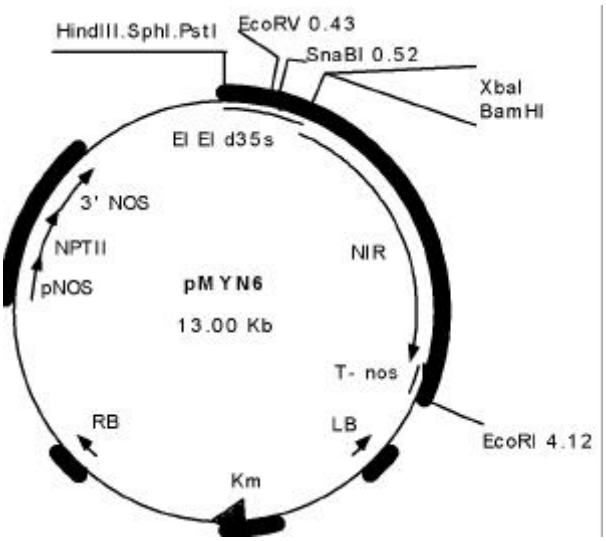


Figure 4. Schematic diagrams of pMYN6. DNA fragment of 3.0Kb containing the coding region of the of *Spinacia oleracea* NiR gene was isolated from the pMYN4 by digestion with *Bam*HI and *Kpn*I, and then ligated into the binary vector pMY27.

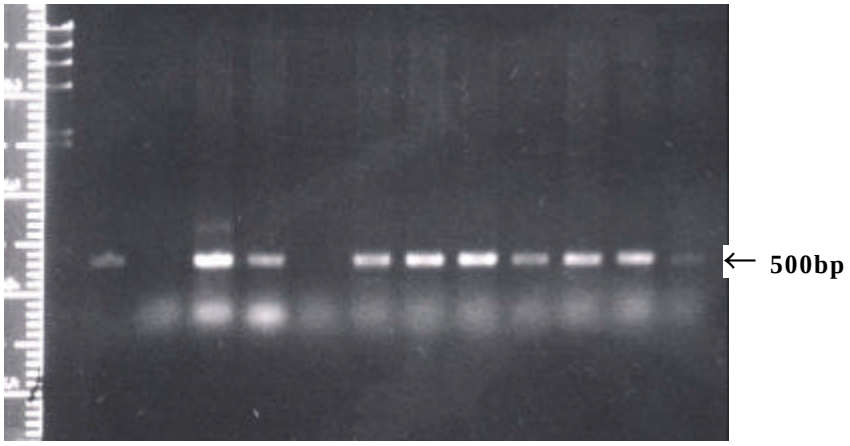


Figure 5. Agarose gel electrophoresis of PCR products of *Spinacia oleracea* NiR gene. PCR was performed onto genomic DNA which were isolated from each ten transformed (3 to 12) and wild type (2) tobacco plants.

(2) 형질전환 캘러스 유도

공조배양 후 4-6 주 사이에 캘러스의 육안적 관찰이 가능하였으며, 형질전환체로 추정되는 캘러스는 대부분 절편체의 절단면에서 형성되기 시작하였다(**Figure 6**). 일단 캘러스 형성이 육안으로 관찰되면 줄기 유도배지로 계대하였다. 대체로 70%이상의 형질전환된 것으로 추정되는 캘러스가 형성되었으나, 절편체가 너무 약한 것은 그대로 고사되었다. 캘러스 유도시 첨가된 가나마이신은 50㎎/ℓ 농도로 처리하였다. 예비 실험 결과 대부분 포플러류의 캘러스 형성을 억제하는 가나마이신 농도는 30㎎/ℓ이었다. 따라서 본 실험에서는 50㎎/ℓ 농도로 형질전환 캘러스 선발하였다.

(3) 형질전환 줄기 유도 및 증식

형질전환된 것으로 추정되는 캘러스로 부터 줄기유도는 WPM+Zeatin 1.0, BA 0.1, NAA 0.01㎎/ℓ에 50㎎/ℓ 가나마이신, 500㎎/ℓ 세포탁슘이 첨가된 배지에서 유도하였다. 줄기유도율은 약 30%내외로 캘러스 형성율보다 낮았다. 캘러스는 여러 형태로 생장하였는데 붉게 착색되고, 생장이 빠른 것은 줄기분화가 되지 않았다. 비교적 생장이 느리고 단단한 캘러스에서 줄기가 유도되었다. 한편 캘러스에 따라 부정근이 발생되는 것도 많았다. 이렇게 줄기형성 없이 부정근이 형성되는 것은 줄기가 거의 유도되지 않았다. 본 실험에서는 아그로박테리움에 감염 후 캘러스 형성없이 직접 부정아가 형성되는 형태로 형질전환된 줄기유도를 시도해 보았다. 이 방법은 기내 줄기분화가 매우 용이한 담배에서 사용되어온 방법이다. 수원포플러에서는 부정아 유도에 의한 형질전환체 유도가 매우 효과적이었다. **Figure 7**과 같이 절편체 모두에서 형질전환된 것으로 추정되는 줄기가 형성되었는데 이것은 캘러스 유도 후 줄기를 유도하는 방법에 비해 매우 효율적인 방법이라 할 수 있다. 하지만 이렇게 부정아로 형성된 줄기가 모두 형질전환된 것은 아니었다. 실제 분석결과 이러한 줄기는 대부분 정상적인 부정아 유래 줄기로 나타났으며, 형질전환된 것으로 확인된 줄기는 약 15% 이었다. 따라서 수원 포플러의 형질전환체 유도는 기존의 캘러스유

도 → 줄기분화가 바람직하다고 생각되며, 부정아 유도법을 사용하기 위해서는 가나마이신 선발 농도등을 고농도로 하여 형질전환된 줄기만을 선발시키는 것이 바람직하다고 판단되었다.

일단 줄기가 분화되면 증식은 크게 문제시되지 않았다. 목본식물의 조직배양에서 상용되는 WPM 이나 MS배지에 BA 0.2㎎/ℓ 혹은 zeatin 0.5 2.0㎎/ℓ 첨가된 조건에서 매월 2 5배 줄기증식이 가능하였다(**Figure 8A**). 줄기 증식과정에서는 과수화된 줄기로 자라는 것도 상당히 많았다(**Figure 8B**). 이 같은 줄기는 gelrite 배지에서 현저했는데, 과수화되어 자라는 줄기는 가늘고 길게 자라며, 발근이 저조하여 증식에 비효과적이었다. 과수화의 문제는 아가를 gum-agar와 gelrite로 혼합 처리하고, 배양용기를 좀 더 큰 것으로 사용했을 때 방지될 수 있었다. 한편 정상적인 줄기의 발근은 염류를 반감시킨 조건에서 IBA 0.2 0.5㎎/ℓ 첨가시키거나, 직접 인공배양토에 기외 삽목 후 가습해 주면 발근 및 활착에 어려움이 없었다.

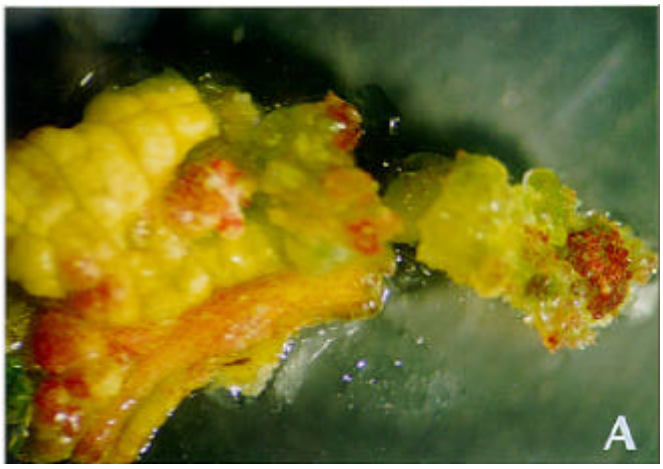


Figure 6. Transgenic callus of popular with pMYN6 on the MS media containning of 50㎎/ℓ Kanamycin.

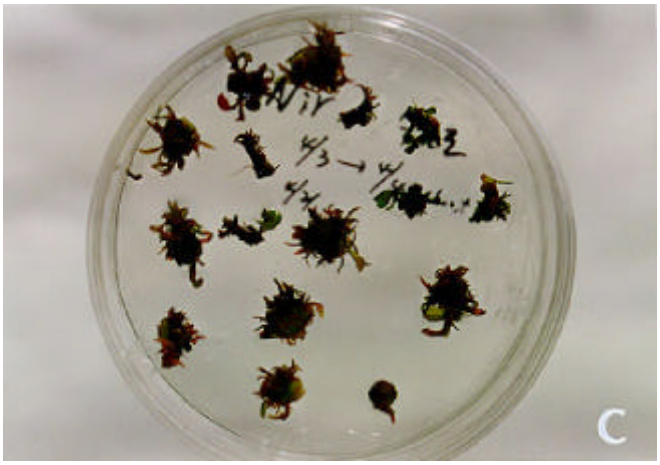
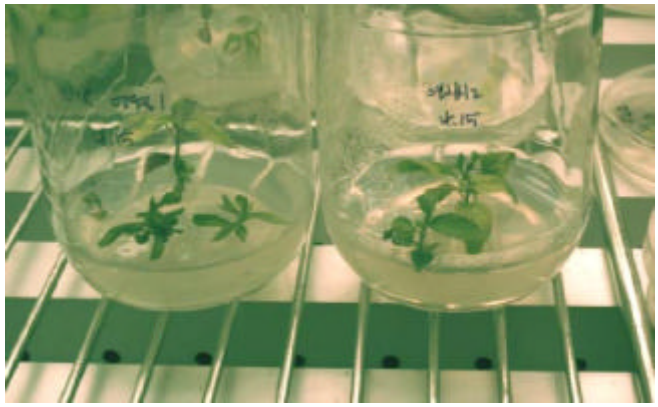


Figure 7. Transgenic popular with pMYN6 on the MS media containning of 50㎎/ℓ Kanamycin.

A



B

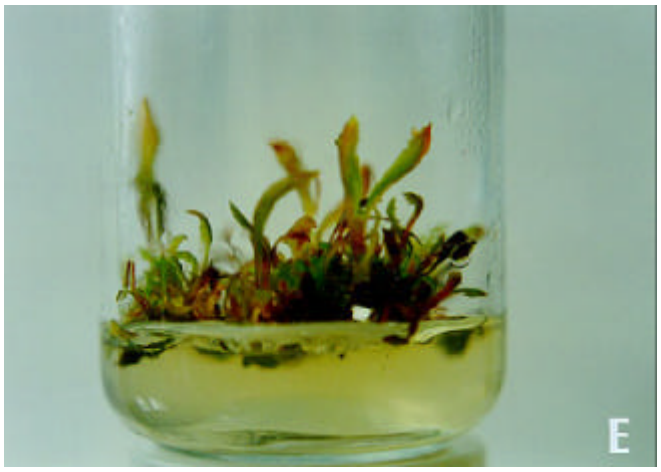


Figure 8. Plant regeneration from the leaves of popular. (A) Multiple shoots regeneration from the cotyledon, (B) Shoot browning of multiple shoots on the growth regulator free-MS medium.

5. 형질전환체의 유전자 발현 확인

가. 형질전환 담배의 NiR 유전자 발현

NiR 유전자를 포함하는 *A. tumefaciens* LBA4404를 담배의 엽과 공동배양을 통하여 카나마이신 저항성 식물체를 선발하고, *Spinacia oleracea* NiR gene에 특이적인 primer를 이용한 PCR 결과 *Spinacia oleracea* NiR gene 유전자의 도입을 확인된 형질전환체의 유전자 발현정도를 확인하였다(**Figure 9**). Northern-blot analysis 결과 wild type담배에서는 광조건 에서만 유전자의 발현이 확인되었으며(WL) 암조건에서는 유전자의 발현이 확인되지 않았다(WD). 그러나 형질전환체는 명조건과 암조건에서 NiR 유전자의 발현을 모두 확인하여 형질전환체에서 NiR유전자가 빛에 관계없이 항시적으로 발현하고있음을 확인하였다.

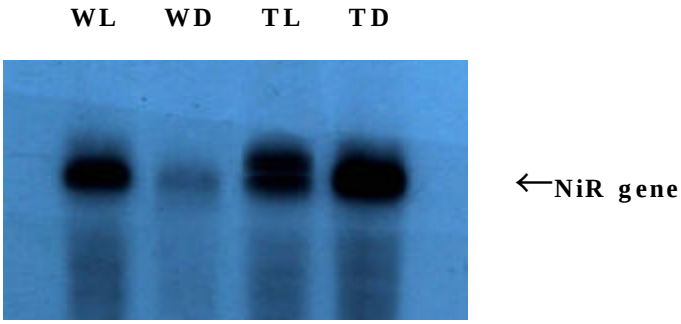


Figure 9. Northern blot analysis of NiR mRNA levels in leaves of both the wild-type(W) and transgenic tobacco(T). WL, wild type tobacco at 2 day after the transfer into continuous light condition; WD, wild type tobacco at 2 day after the transfer into continuous dark condition; TL, transgenic tobacco at 2 day after the transfer into continuous light condition; TD, transgenic tobacco at 2 day after the transfer into continuous dark condition.

나. 포플러의 NiR 유전자발현

NiR 유전자를 포함하는 *A. tumefaciens* LBA4404를 포플러의 엽과 공동배양을 통하여 카나마이신 저항성 식물체를 선발하고, *Spinacia oleracea* NiR gene에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 실행한 결과 *Spinacia oleracea* NiR gene 유전자의 도입이 확인된 형질전환체의 유전자 발현정도를 확인하였다(**Figure 10**). Northern-blot analysis 결과 wild type 포플러에서는 광조건 에서만 유전자의 발현이 확인되었으며(WL) 암조건에서는 유전자의 발현이 확인되지 않았다(WD). 그러나 형질전환체는 명조건과 암조건에서 NiR 유전자의 발현을 모두 확인하여 형질전환체에서 NiR유전자가 빛에 관계없이 항시적으로 발현하고있음을 확인하였다.

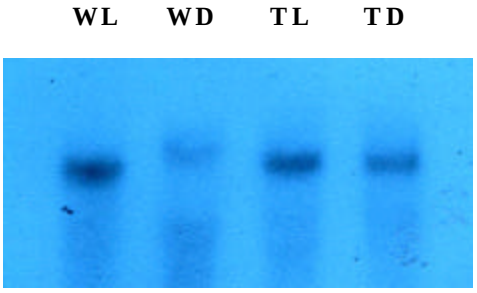


Figure 10. Northern blot analysis of NiR mRNA levels in leaves of both the wild-type(W) and transgenic popoular(T). WL, wild type popoular at 2 day after the transfer into continuous light condition; WD, wild type popoular at 2 day after the transfer into continuous dark condition; TL, transgenic popoular at 2 day after the transfer into continuous light condition; TD, transgenic popoular at 2 day after the transfer into continuous dark condition.

6. 형질전환 식물체의 NiR 효소활성

담배에 있어서 질소원의 농도에 따른 NiR 효소의 활성정도를 확인하기 위하여 KNO_3의 농도에 따른 NiR 효소의 활성을 확인하였으며 그의 결과는 **Table 1**과 같다.

Table 1. NiR activity in leaves of tobacco seedling grown with 15 mM KNO3 in the substrate

KNO3 con.(mM)	NiR activity (Unit per 100 mg FW)			
	WL	WD	TL	TD
0	21 ± 0.4	6 ± 0.4	26 ± 0.3	25 ± 0.4
5	24 ± 0.5	14 ± 0.5	28 ± 0.6	25 ± 0.7
10	27 ± 0.5	17 ± 0.5	35 ± 0.4	30 ± 0.3
15	30 ± 0.3	16 ± 0.3	39 ± 0.7	32 ± 0.6
20	24 ± 0.2	17 ± 0.2	29 ± 0.4	24 ± 0.4

W, wild type plant; T, transgenic plant; D, dark condition; L, light condition

KNO_3의 농도에 따른 NiR 효소활성은 wild type과 형질전환체 모두에서 KNO_3의 농도가 증가함에 따라 NiR 효소활성이 증가함을 보였고, KNO3 20mM의 농도에서는 wild type과 형질전환체 모두에서 NiR 효소활성이 억제됨을 나타내었다. 광조건에 따른 NiR 효소활성은 wild type에 있어서 광이 존재할 때 KNO_3의 모든 농도에서 암조건하의 담배보다 높은 NiR 효소활성을 보였다. 형질전환체 식물은 KNO_3의 농도에 의해서만 NiR 효소활성에 영향을 보이고 있으며, 광조건에 따른 NiR 효소활성에의 차이는 보이지 않았다. 한편, KNO3 무처리구에서의 wild type과 형질전환체

의 NiR 효소활성은 크게 차이를 나타내어 형질전환체가 3-4배정도의 높은 NiR 효소활성을 나타내고 있다.

선발되어진 형질전환체의 NO_2^-의 분해능력을 조사하기 위하여 유전자 도입이 확인된 형질전환체의 종자를 MS 배지(모든 질소원을 제거 한 후에 KNO_3를 15 mM 농도로 처리)에서 발아 2주 후 연속광 또는 암조건에서 2일간 배양하였다. 2주 후 담배의 잎을 이용하여 NiR 효소활성을 조사하였으며, NiR 효소활성은 Schuster(1987)의 방법에 준하여 실시하였다.

Table 1에서 확인한 바와 같이 KNO_3의 농도에 따른 NiR 효소활성은 KNO_3의 농도가 15 mM에서 가장 높은 효소 활성을 보였으므로, KNO_3의 농도를 15 mM로 첨가한 후에 광원의 차이에 따른 효소활성의 차이를 확인하였으며, 그의 결과는 다음 Table 2와 같다.

Table 2. NiR activity in leaves of tobacco seedling grown with 15 mM KNO_3 in the substrate

Treatment	NiR activity (Unit per 100 mg FW)	
	red light (10 W · m-2)	blue-light (10 W · m-2)
WL	29.4 ± 0.8	34.5 ± 0.8
WD	17.3 ± 0.7	16.9 ± 0.7
TL	31.2 ± 1.0	37.2 ± 1.0
TD	27.9 ± 0.5	29.5 ± 0.5

W, wild type plant; T, transgenic plant; D, dark condition; L, light condition

NiR 효소활성의 분석 결과 같은 광원조건 하에서는 wild type 담배와 형질전환체의 NiR 효소활성에 차이가 인정되지 않았으나, 암조건 하에서는 wild type 담배와 비교하여 형질전환체의 NiR 효소활성이 약 1.5 - 1.7 배정도 높게 확인이 되었다.

이는 Northern-blot analysis 결과와 일치하는 것으로 형질전환체에서 NiR유전자가 빛에 관계없이 항시 발현하여 NiR 효소활성을 보이고 있다. 또한, 적색광과 청색광에 따른 NiR 효소활성의 차이는 청색광원에서 wild type 담배와 비교하여 형질전환체의 NiR 효소활성이 약간 높게확인 되었다.

第 4 節 要約 및 結論

유전공학적 기법을 이용하여 대기오염 정화 포플러의 육종을 위하여 시금치로부터 3.0 Kb에 해당하는 Nitrite reductase (NiR)의 유전자를 PCR기술을 이용하여 분리하였다. 분리된 시금치의 NiR 유전자의 염기를 확인 한 후에 duplicated CaMV 35S promoter를 갖고있는 식물발현용 vector인 pMY27에 도입하여 pMYN6을 구축하였다. pMYN6을 *A. tumefaciens*에 도입 한 후에 *A. tumefaciens*을 이용하여 담배와 포플라에 형질전환 시켰다. 항생제에 저항성을 보이는 재분화 식물체를 획득하고 PCR 기술을 이용하여 유전자의 도입여부를 확인하였다. 도입된 시금치의 NiR 유전자가 정상적으로 발현하는지의 여부는 Northern blot analysis를 통하여 확인하였다. Wild type과 형질전환체의 NiR 효소활성은 크게 차이를 나타내어 형질전환체가 3-4배정도의 높은 NiR 효소활성을 나타내었다.

引用文献

Ashenden,T.W. & Mansfield, T. A.(1978) Nature 273, 142-143

Henikoff, S. (1984) Gene 28:351-356.

Kang, R., Chan, A., Daly, M., and McPherson, J. (1987) Science 236:1299-1302.

Omase,K.,Hashimoto,Y.& Aliga, I.(1983) Plant Cell Physiol. 24: 281-288

Sanders, P. (1987) Nuc. Acid Res. 15:1543-1558.

Sanger, F., and Nicklen, S. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74:5463-5467.

Schuster, C., and Oelmuller, R., Mohr, H. (1987) Planta 171: 136-143.

Shiraishi, N., Kubo, Y., Takaba, K., Kiyota, S., Sakano, K., and Nakagawa, H. (1991) Plant Cell Physiol 32: 1031-1038

Takeuchi, Y., Nihira, J., Kondo,N. & Tezuka, T. (1985) Plant Cell Physiol 26: 1027-1035

Yoneyama, T. & Sasakawa, H.(1979) Plant Cell Physiol. 20: 263-266

Yoneyama, T., Sasagswa,H., Totsuka,T. & Yamamoto,Y.(1978) Progress report in 1976-1977. Report of special research project, NIES R-2: 103-111

Yoneyama, T., Sasakawa, H.,Ishizuka, S. & Tothuka, T.(1979) Soil Sci. Plant Nutr. 25: 267-275