

지황 기내배양시 투명화된 잎과 정상잎간의 조직학적 관찰

백기엽* · 유광진 · 박상일¹ · 신응현²

충북대학교 농과대학 원예학과 ¹충북대학교 농과대학 농학과, ²중부대학교 원예학과

Anatomical Observation of Vitrified and Glaucous Leaf from *Rehmannia glutinosa* Plant Produced in Vitro

PAEK, Kee Yoeup* · YU, Kwang Jin · PARK, Sang Il¹ · SHIN, Sung Ryeon²

Department of Horticulture, Chung Buk National Univ., Cheongju, 360-763, Korea:

¹Department of Agronomy, Chung Buk National Univ., Cheongju 360-763, Korea: and

²Department of Horticultural Science, Joongbu Univ., Kumsan, 312-940, Korea, *Corresponding author.

Addition of growth inhibitors such as ancymidol, ABA, chloromequat, and paclobutrazol into MS medium had no effect to preventing vitrification in cultures of *Rehmannia glutinosa*. Anatomical investigation revealed that vitrified thick leaf tissue in vitro had larger intercellular space with poor development of sponge and pallsade tissue compared to those of in vitro grown glaucous and field grown plants. In vitro grown glaucous leaf had smaller and round type stomata showing distinguishable guard and subsidiary cell than those of reestablished plantlets into soil whereas abnormal stomata and poor development of epicuticular wax on the surface of leaf was observed in vitrified plantlet.

Key words: growth inhibitor, vitrification, pallsade cell, subsidiary cell, epicuticular wax

지금까지 지황의 기내 증식체계 확립을 위한 일련의 실험에서 투명화 묘의 발생이 많아 이의 억제 방안 마련이 필요할 것으로 보인다. 기내에서 투명화된 묘는 생존율이 낮아 생산효율이 떨어지는 결점이 있었기 때문에 투명화를 억제시키기 위한 방법의 개발이 요구되고 있다. 투명화란 기내 배양시 비정상적인 수분흡수로 인하여 세포가 이상 비대하여 결과적으로 조직 전체나 일부분이 이상 비대해지고 물러지는 생리적 장애를 말한다. 그 특성은 형태학적(Debergh et al., 1981; Letouz and Debergh, 1983), 해부학적(Brainerd et al., 1981; Paques and Boxus, 1987; Capellades et al., 1990), 생화학적(Gaspar et al., 1987)인 측면 등으로 매우 다양한 양상을 나타내고 있다. 그러나 지금까지 이러한 생리적 장애를 총칭하여 투명화라고 하여 왔으나 최근에는 투명화란 단어가 저온생물학에서 주로 사용되는 용어이기 때문에 이를 조직이 수분을 과다하게 함유하고 있거나 흡수하는 뜻을 가지고 있는 'hyperhydricity'로 변경하자는 주장도 있다(Debergh, 1992). 지금까지 알려진 투명화발생의 억제책으로는 응고제의 농도를 높여 수분의 흡수를 억제하는 방안(Debergh et al., 1981; Ziv et al., 1983), 용기의 뚜껑 등

에 멤브레인 필터 장치를 설치, 호흡율을 높여 용기내 생장 가스의 배출을 원활하게 해주는 방안(Debergh, 1991) 등이 보고되었다.

본 실험에서는 생장억제제가 기내에서 발생하는 투명화에 미치는 영향을 알아보고 정상묘와 투명화묘간에 잎의 조직학적 및 기공의 형태적 특성을 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

생장억제제가 투명화묘 발생에 미치는 영향

지황의 조직배양시 증식율이 양호했던 5.0 mg/L BA, 0.3 mg/L IAA 및 0.6% Bacto agar가 첨가된 MS배지에 생장억제제인 ancymidol, ABA, chloromequat 및 paclobutrazol을 0.22 μ m millipore 멤브레인 여과지로 살균한 다음 1.0, 3.0, 5.0, 10.0 mg/L로 그 농도를 구분하여 첨가하고 배양 5주후 생장특성을 조사하였다. 배양실의 온도는 25 \pm 2 °C로 조절하였으며 형광등(1500 lx)으로 16시간 조명하였다.

건전묘와 투명화 묘의 조직학적 관찰

기내에서 생산된 묘를 포장에 심어 1개월이 경과된 식물체의 잎, 성장억제제가 첨가되지 않은 배지에서 배양한 기내 건전묘, 0.3 mg/L BA가 첨가된 배지에서 배양한 외견상 건전해 보이는 묘, 3.0 mg/L BA가 첨가된 배지에서 배양한 투명화묘의 잎을 채취하여 FAA용액에 고정시킨후 에탄올 과정을 거쳐 탈수시킨 다음 paraplast로 포매하였다. 포매한 표본은 마이크로톰으로 5 μ m 두께로 절편을 만든다음 TBO(Toluidine Blue O)로 염색하였으며 건조후 DPX mountant로 영구표본을 제작한 후 현미경으로 관찰하였다 (Yeung, 1984).

또한 기공의 형태를 비교하기 위하여 채취한 재료를 2% glutaraldehyde가 포함된 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.2)에 고정시킨다음 다시 1%(w/v) osmium tetroxide와 에탄올 과정을 거쳐 고정 및 탈수시키고 critical point drying 방식에 의해 건조시켰다. 건조시킨 표본을 금으로 sputter coating하여 주사전자 현미경(Hitachi 570)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

성장억제제가 투명화묘 발생에 미치는 영향

BA 5.0 mg/L와 IAA 0.3 mg/L가 첨가된 신초증식용 배지에 4종의 성장억제제를 농도별로 첨가하여 성장반응을 조사해본 결과(Table 1) 생체중은 정단의 경우 대조구 2161 mg인데 비해 ancymidol 3.0 mg/L, chloromequat 5-10.0 mg/L, paclobutrazol 10.0 mg/L첨가배지에서만 대조구보다 증가하였고 나머지 처리구에서는 감소하였다. 생체중이 증가한 이들 배지에서는 배양절편의 기부가 팽대하면서 캘러스화하였고 표면에는 무수한 신초 원기가 형성되었으나 정상적으로 생장이 이루어지지 않았는데 이는 조직배양에서도 동일한 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 배지와 접촉한 잎은 ABA처리구를 제외하고는 거의 대부분 hyperhydration화하여 수침화하는 현상을 나타냈다.

신초형성수를 보면 정단조직에서 ancymidol 3.0 mg/L처리구를 제외하고는 대조구 16.4개에 비해 감소하였으며 마디 조직에서는 ancymidol 10.0 mg/L, chloromequat 1.0, 5.0 및 10.0 mg/L, paclobutrazol에서는 1.0 mg/L첨가구를 제외하고는 대조구 13.4개에 비해 감소되었다. 형성된 신초의 성장을 보면 거의 대부분 처리구에서 rosette화 되어 억제되는 현상을 나타내었는데 성장억제제의 종류나 농도간 큰 차이를 나타내지 않았다. 투명화 억제에 미치는 억제제의 효과는 이러한 결과는 안개초의 조직배양에서도 보고된 바 있다 (Han et al., 1991). 또한 카네이션 조직배양시 ABA첨가는

투명화 방지에 효과가 없으며 액체배양한 글라디올라스나 필로덴드론에 GA길항제인 ancymidol이나 paclobutrazol처리 는 잎의 전개를 억제하나 투명화 방지에 다소 효과적이라는 보고(Ziv, 1991)도 있으나 본 실험의 결과와는 차이가 있었다. 이상의 연구 결과로 배지내 성장억제제의 첨가는 지황의 신초 및 마디배양시 발생하는 투명화의 억제에 효과가 없었으나 성장억제제의 효과에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

건전묘와 투명화묘의 조직학적 관찰

기내에서 발생된 투명화묘와 건전묘의 잎을 횡단 절편해 본 결과는 Figure 1과 같다. 포장에서 순화하여 1개월이 경과한 식물체의 잎을 식물체의 잎을 보면 유관속이 잘 발달해 있을 뿐아니라 책상 및 해면세포의 발달이 양호하고 엽조직내 세포간극의 비율이 적어 조직자체가 매우 치밀함을 알수 있다(Figure 1A). MS 기본배지에서 배양한 기내 건전묘의 잎을 보면(Figure 1B)포장에서 순화된 식물체보다는 엽조직내 치밀도가 떨어지나 세포간극이 차지하는 면적이

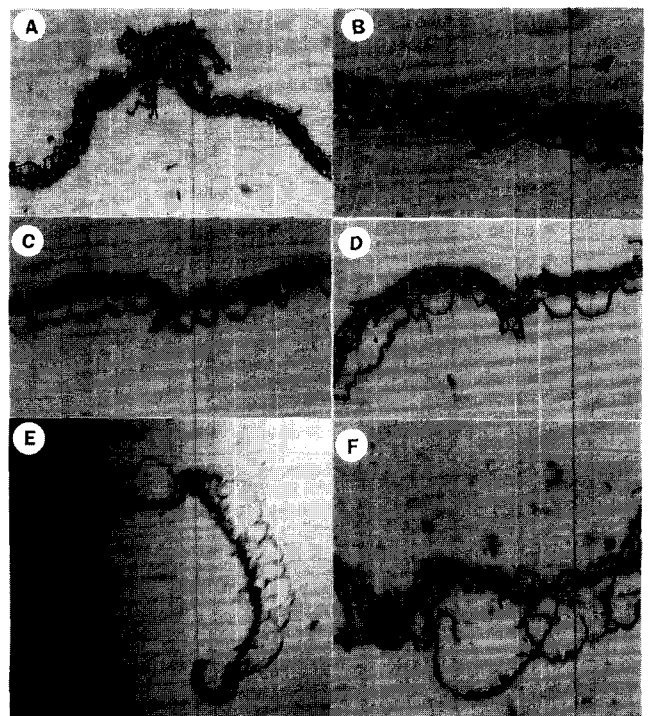


Figure 1. Transverse section of glaucous and vitrified leaves of *Rehmania glutinosa*, $\times 100$.

A: leaf taken from field grown plant.

B: glaucous leaf cultured on MS basal medium.

C: and D: slightly vitrified leaves cultured on MS medium with 0.3 mg/L BA.

E: and F: severely hyperhydrated leaves cultured on MS medium supplemented with 5.0 mg/L BA. Arrows indicated large intercellular space.

Table 1. Effect of growth inhibitors on the organogenesis and vitrification from in vitro cultured shoot tips and node-buds of *Rehmannia glutinosa* after 5 weeks in culture.^a

Explant	Growth inhibitor (mg/L)	No. shoots /explant (\pm SE)	Mean shoot length (cm \pm SE)	Fresh wt /explant (mg \pm SE)	Vitrification ^b		
Shoot-tip	Control	1.3 \pm 0.4	16.4 \pm 2.6	2161 \pm 543	+++		
	Ancymidol	1.0	1.0 \pm 0.2	1680 \pm 328	+++		
		3.0	1.6 \pm 0.3	17.9 \pm 3.7	2573 \pm 601	+++	
		5.0	0.7 \pm 0.1	9.4 \pm 1.7	1541 \pm 470	+++	
		10.0	1.6 \pm 0.5	11.6 \pm 3.5	1878 \pm 276	+++	
	ABA	1.0	1.2 \pm 0.5	12.9 \pm 4.2	1894 \pm 597	+++	
		3.0	0.8 \pm 0.2	13.3 \pm 0.6	1585 \pm 356	+++	
		5.0	1.0 \pm 0.3	11.5 \pm 2.8	1250 \pm 900	+	
		10.0	1.3 \pm 0.2	11.4 \pm 2.0	1540 \pm 474	++	
	Chloromequat	1.0	1.5 \pm 0.2	10.8 \pm 2.3	1968 \pm 420	+++	
		3.0	1.0 \pm 0.4	14.6 \pm 1.2	2103 \pm 333	+++	
		5.0	1.7 \pm 0.6	15.6 \pm 2.2	1381 \pm 366	+++	
		10.0	1.8 \pm 0.8	14.5 \pm 4.2	1181 \pm 392	++	
	Paclobutrazol	1.0	1.2 \pm 0.6	7.8 \pm 1.4	1348 \pm 387	+++	
		3.0	1.6 \pm 0.2	10.9 \pm 2.1	1174 \pm 290	+++	
		5.0	1.8 \pm 0.5	12.6 \pm 1.2	2108 \pm 590	+++	
		10.0	1.6 \pm 0.5	9.8 \pm 2.1	2464 \pm 760	+++	
	Node-bud	Control	1.2 \pm 0.5	13.4 \pm 3.8	2304 \pm 560	+++	
		Ancymidol	1.0	1.3 \pm 0.4	8.4 \pm 1.4	2230 \pm 750	+++
			3.0	1.9 \pm 0.6	11.0 \pm 3.2	2290 \pm 375	+++
		5.0	2.0 \pm 0.7	11.4 \pm 4.2	2874 \pm 827	+++	
		10.0	1.5 \pm 0.3	14.8 \pm 3.5	2006 \pm 575	+++	
ABA		1.0	1.4 \pm 0.4	12.9 \pm 3.0	1663 \pm 332	+++	
		3.0	0.9 \pm 0.3	13.4 \pm 4.7	1340 \pm 472	+++	
		5.0	0.8 \pm 0.3	7.0 \pm 1.9	626 \pm 145	+	
		10.0	1.2 \pm 0.3	13.3 \pm 5.3	1054 \pm 234	++	
Chloromequat		1.0	1.6 \pm 0.5	13.9 \pm 3.2	1816 \pm 330	+++	
		3.0	1.6 \pm 0.4	11.4 \pm 3.7	2016 \pm 563	+++	
		5.0	1.9 \pm 0.5	14.1 \pm 5.4	1799 \pm 264	++	
		10.0	1.4 \pm 0.6	19.8 \pm 3.1	2604 \pm 645	+++	
Paclobutrazol		1.0	1.6 \pm 0.5	18.5 \pm 3.4	2039 \pm 503	+++	
		3.0	1.6 \pm 0.4	13.3 \pm 2.1	2575 \pm 636	+++	
		5.0	1.9 \pm 0.7	9.5 \pm 0.7	1984 \pm 0.41	+++	
		10.0	1.7 \pm 0.7	10.3 \pm 2.2	1914 \pm 466	+++	

^a Addenda to the Murashige-Skoog medium were as follow: 5.0 mg/L BA , 0.3 mg/L IAA and 0.6% Bacto agar.

^b + = mild : ++ = moderate : +++ = severe.

적고 책상세포의 발달은 불량하나 해면세포가 잘 발달되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

BA가 0.3 mg/L첨가된 배지에서 배양한 식물체의 잎을 보면(Figure 1C, D) 기본배지에서 배양한 식물체와는 달리 잎 조직내 절반이상이 세포간극으로 구성되어 있어 조직의 치밀도가 떨어짐을 알 수 있었다. 그러나 외견상으로 보면 식물체는 정상인 것처럼 보였으며 이들 식물체를 포장에 옮겨 순화시키면 생존율은 기본배지에 배양한 식물체보다 다소 떨어지나 80%이상을 나타냈다. 그러나 BA 5.0 mg/L첨가 배지에서 배양한 투명화가 심한 식물체의 잎을 보면(Figure 1E, F) BA 0.3 mg/L 첨가배지에서 배양한 식물체보다 잎이 두껍고, 잎조직의 대부분이 세포간극으로 구성되어 있어 이들 식물체를 포장으로 이식하였을 경우에는 전부 고사하는 원인이 됨을 알 수 있었다. 투명화가 심한 식물체의 잎은 잎이 두껍고 넓으며, 주름이 있거나 비틀러있

고, 쉽게 부서지기 쉬운조직으로 되어있는 것이 특징이었다. 이와 같은 결과는 안개초(Han et al., 1992)나 카네이션(Kim and Byun, 1988)조직배양에서도 관찰되며 투명화가 심할수록 책상세포의 발달이 불량하고 세포간극이 차지하는 면적이 증가하는 면적이 증가하여 이들 조직속에 과다한 수분을 보유함으로써 생체중이 증가하고 잎이 두꺼워지게 된다. 주사형 전자현미경으로 잎의 앞뒷면의 구조와 기공의 형태적 특징을 조사해본 결과는 Figure 2, 3과 같다. 포장에서 순화된 식물체의 잎을 보면(Figure 2A, B) 기내건전묘의 잎(Figure 2C, D)보다 기공수도 많고 기공이 크며 타원형으로 되어 있는데 반해 기내 건전묘는 기공이 돌출되어 있으며 둥근모양을 하고 있는 것이 특징이었다. 또한 잎의 향측측(adaxial side)을 보면 포장순화묘나 기내 건전묘에서는 그물모양의 등성(ridge)이 작고 규칙적으로 잘 발달되어 있으나 기내 투명화 묘(Figure 3A)는 등성모양이 상당히 크고,

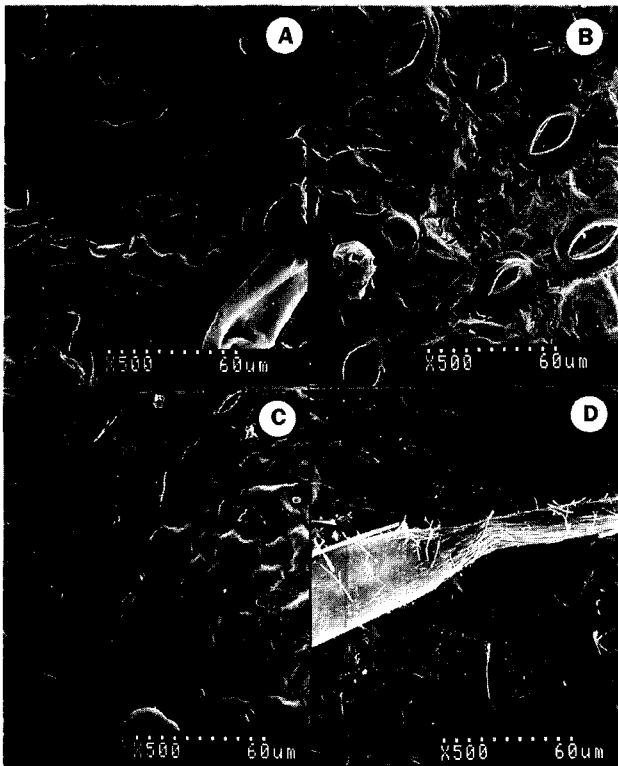


Figure 2. Scanning electron micrographs of adaxial (A and C) and abaxial (B and D) leaf surface of *Rehmania glutinosa* grown field condition (Top) and in vitro grown glaucous (bottom) plant.

기공의 모양도 불완전하며 epicuticular wax rod의 형성이 전혀 이루어져 있지 않았다. 또한 투명화 묘의 항배측(abaxial side)에 형성된 기공은 건전묘에 비해 상당히 돌출되어 있으며 공변세포나 부세포의 형태가 갖추어져 있지 않아 기공의 개폐작용능력을 상실할것처럼 보였다(Figure 3B). 이러한 사실은 투명묘를 포장에 이식하였을 경우 기공이 항상 열려있음으로 해서 과다한 수분손실로 인해 위조하여 고사하는 원인이라 생각되었다. 이상과 같이 건전묘에 비해 투명화묘는 기공의 형태나 잎의 구조면에서 여러가지 비정상적인 특징을 가지고 있었다. 특히 투명묘에서는 epicuticular wax가 형성되지 않아 기공으로부터 수분이 손실되는 외에도 표피로부터 증산작용이 과도하게 일어나므로 식물체가 생존하지 못하고 고사하게 된다고 생각되었다.

시시-본 연구는 농촌진흥청 특정 연구개발사업비 지원으로 수행된 결과의 일부임.

적 요

배지내 생장억제제의 첨가는 투명화 방지에 효과가 없었다. 기내에서 생산된 건전묘와 투명화묘에 있어서 잎과 기

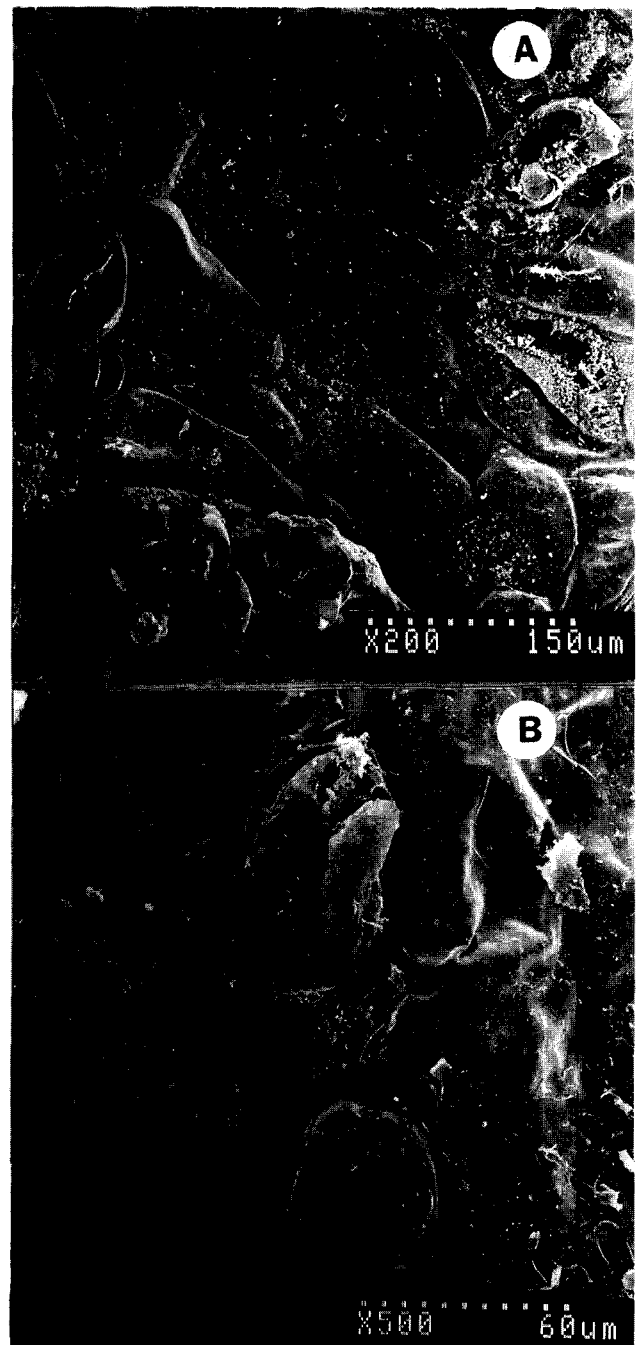


Figure 3. Scanning electron micrographs of adaxial (A) and abaxial (B) leaf surface of hyperhydrated plantlets cultured on MS medium supplemented with 5.0 mg/L BA.

공의 구조적 및 형태적 특징을 조사해본 결과 기내건전묘나 포장활착묘는 책상 및 해면세포의 발달이 양호하고 세포간극이 차지하는 면적이 적었으나 기내 투명화묘는 책상세포의 발달이 불량하고 세포간극이 차지하는 면적이 현저히 많았다. 기공의 특성을 조사해본 결과 기내 건전묘는 포장활착묘에 비해 기공의 크기가 작았으며 둥근형태를 띠고

있었으나 투명화묘에 비해 공변세포와 부세포의 구별이 명확하였다. 또한 투명화묘에서는 기공의 형태가 비정상적이었고 표피 왁스의 발달이 전혀 관찰되지 않았다.

인용문헌

- Brainerd KE, Fuchigami LH, Kwiatkowski S, Clark CS** (1989) Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments, *HortScience* 16: 173-175
- Capellades M, Fontarnau R, Carulla C, Debergh P** (1990) Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue cultured *Rosa multiflora*. *J Amer Soc Hort Sci* 115: 141-145
- Debergh P, Harbaoui Y, Lemeur R** (1981) Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential, *Physiol Plant* 53: 181-187
- Debergh P** (1991) Acclimatization techniques of plants from in vitro, *Acta Hort* 289: 291-300
- Debergh PJ, Aitken-Christie D, Cohen B, Grout S, von Arnold R, Zimmerman, Ziv M** (1992) Reconsideration of the terms 'vitrification' as used in micropropagation, *Plant Cell Tissue Organ Culture* 30: 135-140
- Gaspar T, Kevers C, Debergh P, Maene L, Paques M, Boxus P** (1987) Vitrification : morphological, physiological and ecological aspects, In Bonga JM, Durzan DJ, eds, *Cell and tissue culture in forestry*, Vol 1, Kluwer Academic Press Publ., Dordrecht, pp 152-166
- Han BH, Paek KY, Choi JK** (1991) Prevention of vitrification of *Gypsophila paniculata* Regenerated in vitro, *J Kor Soc Hort Sci* 32: 518-524
- Han BH, Paek KY, Choi JK** (1992) Structural characteristics of vitrified and clauous Plantlets in *Gypsophila paniculata* L. in vitro, *J Kor Soc Hort Sci* 33: 177-189
- Kim WK, Byun NS** (1988) Physiological and Morphological Characteristics of the Glauous and vitreous carnation plantlets obtained in vitro, *J Kor Soc Hort Sci* 29: 216-223
- LetouzeR, Daguin F** (1983) Manifestation spontaee d'une croissance anormale en culture in vitro. Recherche de marqueurs m taboliques, *Rev Can Biol Exp* 42: 23-28
- Paques M, Boxus** (1987) A model to learn 'vitrification' the rootstock apple M. 26. Present results, *Acta Hort* 212: 193-210
- Yeung, EC** (1984) Histological and biochemical staining procedeurs, In IK Vasil, eds, *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, Vol 1. Academic Press, pp 689-697

(1996년 11월 9일 접수)