

越冬期 뽕나무 가지 皮層部 細胞內 微細構造의 變化

崔榮哲 · 柳根燮* · 安永熙**

農業科學技術院 蠶絲昆蟲部

*慶北大學校 農科大學

**中央大學校 産業大學

Ultrastructural Changes in the Cortical Cell of Mulberry Trees(*Morus*) during Wintering Period

Young Cheol Choi, Keun Sup Ryu* and Young Hee Ahn**

Department of Sericulture and Entomology, National Institute Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

*College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

**College of Industry, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea

ABSTRACT

In relation to cold acclimation, this experiment was carried out to understand the changes of the cortical cells in the living barks of the mulberry during wintering period. The living barks of three mulberry varieties(Kaeryangppong, Shinilppong and Yongcheonppong) were sampled from December, 1995 to March, 1996. The result of this experiment was summarized as follows. The cortical cells in the living barks of the mulberry in December were filled with small vacuoles. Plastids and mitochondrias were located near the nucleus. At this time, almost all starch granules disappeared from the plastids. In January and February, mitochondria, plastids and microbodys of the cortical cell were observed. As increasing temperature from March, dictysomes and polysomes were sparse. Again, starch granules disappeared were observed in the plastids. From the above result, starch granules in plastide of the cortical cell of the mulberry disappeared during cold acclimation stage. After late January, Proplastid was observed in the cortical cell and the ultrastructures of cortical cell were actively changed.

Key words : Mulberry, Cold acclimation, Cortical cell, Microbody, Plastid

緒 言

溫帶性 樹木의 대부분은 겨울동안의 低溫에 살아남기 위하여 충분한 養分을 貯藏하면서 가을에 短日과 低溫등의 環境情報를 받아 서서히 生長速度를 늦추어 休眠에 들어가게 된다. 이 때 植物의 細胞構造와 體內 貯藏物質은 저온에 대처하기 위해 알맞은 형태로 再構成된다. 또한 休眠開始부터 休眠解除에 이르는 동안 植物體 內 각 成分의 代謝作用과 細胞 內 構造物의 형태적인 변화가 일어나며, 越冬期 동안의 저온에 견디기 위해 耐凍性의 增大 등 일련의 변화가 일어난다.

특히 低溫과 乾燥한 氣象條件에 馴化하기 위해 體

內 貯藏物質의 적절한 분배는 물론 生長期와 休眠期에 木本植物의 細胞膜, 液胞, 核, 골기체, 미토콘드리아, 澱粉粒 등 細胞 內 構造의 季節의인 변화가 일어나므로써 耐凍性이 증대되어 凍害를 피할 수 있다(酒井, 1982).

이와 같이 植物細胞는 越冬期에 접어들면 細胞의 構造가 급격히 변하여 그 때까지 세포의 대부분을 차지하는 液胞는 小形化되기 시작하고 그 數도 증가한다. 8월 하순부터 細胞에 澱粉蓄積이 시작되고 9월부터 蛋白質 양이 生長期의 4배나 증가하며, 10월말에는 peroxidase 活性을 보이는 microbody가 생긴다. 이 시기에 peroxidase 活性은 최고에 달하지만 catalase의

활성은 10월을 정점으로 급격히 감소하고 越冬期間 중에 계속 낮은 상태를 유지한다(安, 1989).

그리고 植物耐凍性的季節變化에 대한 세포의 浸透濃度は 현저히 높으며(酒井, 1972), 이것은 脫水 stress를 완화시킨다고 생각되며, 또한 겨울 植物細胞는 細胞의 용적이 현저히 縮小되고 細胞質이 증가한다고 하였다. 休眠期 植物細胞의 生理的 特徵은 細胞質에서 보면 含水量이 적고(55~60% 生重量 當) 糖, 糖알코올, 아미노산 등의 溶質이 많기 때문에 細胞의 浸透濃도가 높고 細胞膜의 물 透過性은 가을에서 겨울에 걸쳐 현저히 높다고 하였다(Levitt and Scarth, 1936; 酒井, 1956).

한편 植物細胞 內 液胞의 기능은 세포의 膨壓을 유지하는 것 외에 老廢物의 저장, stress완화 등 그 역할은 상당히 중요하다고 하였다(Matile, 1975). 그리고 Matile and Moore(1968), Fineran(1971), Villers(1971)의 研究에 의하면 液胞는 動物의 2차 라이소조움과 같은 역할을 하며, 특히 활발한 生長과 分化를 하는 根端細胞에는 많은 小形液胞가 미토콘드리아, 脂肪, 色素體, 小包體, 리보소움 등의 細胞 內 小器官이나 構造物들과 함께 含有되어 있는 것이 顯微鏡에 의해 觀察되었다고 하였다. 그리고 여름과 겨울 植物細胞에는 細胞 內의 微細構造가 다르며, 生長期 아카시아 나무 가지의 皮層部 세포에서는 液胞가 細胞容積의 대부분을 차지하고 核이 세포의 측면에 있으며, 細胞質은 細胞膜의 내측에서 觀察되었다(Pomeroy and Siminovitch, 1971).

또한 겨울 植物細胞에서는 液胞의 小形化가 서서히 진행되지만 겨울부터 봄에 걸쳐 液胞가 차츰 융합되면서 液胞 內에 세포의 小器官들이 채워지며, 開葉期에는 단일의 큰 液胞가 된다고 하였다(大塚, 1972).

Srivastava(1966)는 아메리카 물푸레나무의 形成層을 電子顯微鏡으로 관찰했을 때, 여름과 겨울의 植物細胞 內 微細構造가 현저히 달랐으며, 특히 여름 植物細胞膜은 陷沒되지 않고 平滑하지만 겨울 植物細胞膜은 현저히 陷沒된 상태이며, 液胞가 小包化되어 있다고 報告하였다. Pomeroy and Siminovitch(1971)는 아카시아 가지 皮層 柔細胞의 계절적 形態變化를 조사하였는데, 休眠이 시작되는 가을에서부터 休眠이 解除되고 耐凍性이 저하되는 4월 하순에 걸쳐 細胞膜에 현저한 陷沒과 細胞 內 다수의 小包가 관찰되었으며 이와 같은 膜의 陷沒狀態는 각 종 물리적인 stress를 완화시키는 構造라고 報告하였다. 그러나 耐凍性이 높은 겨울 植物細胞의 構造的 特徵은 細胞膜이 현저히 陷沒된 상태라는 것을 강조했지만, 뽕나무 가지의 嚴冬期 皮層細胞에는 이러한 膜의 陷沒된 상태를 觀察할 수 없었다(Niki and Sakai, 1981). 또한 大塚(1972)는 봄에

뽕나무 皮層部 細胞의 耐凍性和 관련하여 細胞 內의 微細構造의 變化를 조사한 결과 겨울 동안 리보조움은 遊離狀態로 小包像의 滑面小包體가 많이 관찰되었고 봄에는 粗面小包體가 관찰되었다고 하였다. 이들 小包體에는 細胞膜이나 細胞壁 構成物로 생각되는 다수의 小顆粒이 확인되었다. 또한 10월 30일의 細胞는 -10°C 정도의 凍結에도 견딜 수 없을 만큼 耐凍性이 낮았으며 膜의 陷沒狀態도 거의 볼 수 없었으나, 0°C 3시간 硬化하면 耐凍性이 현저히 높아 -70°C의 동결에도 凍死하지 않는다고 하였다.

따라서 이 研究는 耐凍性이 증대되는 시기에 뽕나무 細胞 內 微細構造의 變化를 관찰하여 凍害豫防을 위한 기초자료를 얻고자 이 試驗을 수행하였다.

材料 및 方法

1. 供試品種

供試 뽕나무는 耐凍性이 강한 龍川뽕, 中間인 改良뽕, 그리고 약한 新一뽕 등 3品種을 사용하였으며, 蠶絲昆蟲研究所(舊 蠶業試驗場) 圃場(수원 소재)에서 동일 조건으로 慣行方法에 準하여 管理된 6년생 뽕나무이다.

전자현미경 관찰을 위해 1995년 12월부터 이듬해 3월까지 뽕나무 가지 先端 50 cm 부위에서 10 cm 정도 길이로 試料를 採取하였다. 採取한 가지는 겨울눈을 제거하고 가지 표면의 汚染物質을 완전히 제거하고 먼도날로 외피를 벗겨낸 皮層部를 사용하였다.

2. 電子顯微鏡 觀察

뽕나무 皮層部 조직을 1×0.1×0.05 cm의 크기로 잘라 1% paraformaldehyde와 3% glutaraldehyde가 함유된 0.1M sodium cacodylate 緩衝液으로 2시간 정도 固定한 후 매회 10분 동안 3회 세척하고 같은 緩衝液으로 만든 1% osmium tetroxide로 2시간 2차 고정 후 다시 매회 10분간 3회 세척하였다.

脫水는 50, 70, 90% 에탄올로 10분씩 處理하고 99% 에탄올에 30분씩 2회 그리고 100% 아세톤에 30분간 脫水하였다.

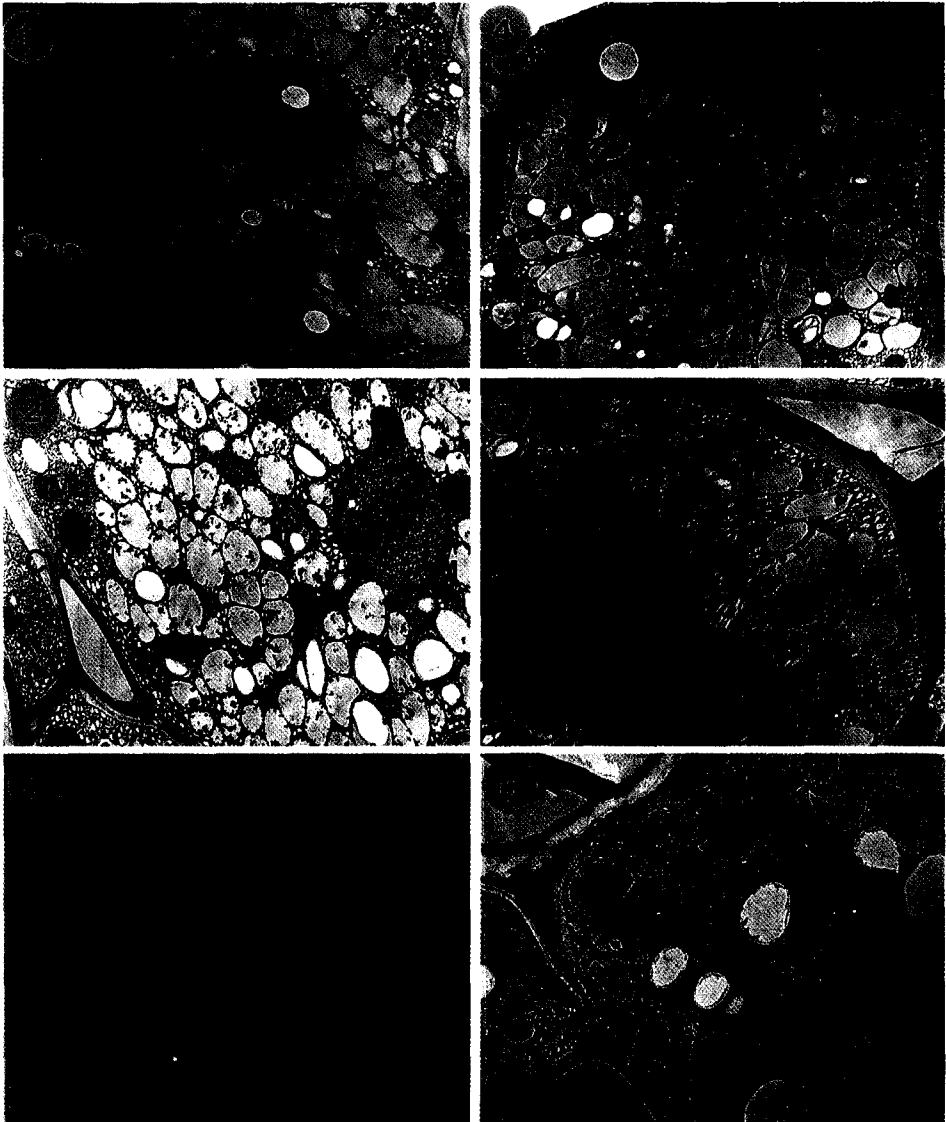
Embedding은 acetone과 resin 混合液(1:1)을 前處理 후 진공펌프로 resin을 脫氣하여 3시간 정도 경과 후 試料를 알맞은 크기로 다시 잘라 폴리판에 넣고 탈기한 Epon 樹脂(Epon 812)를 가득 채운 후 40°C dry oven에 1일, 50°C에서 2일, 60°C에서 2일간 重合하여 block을 硬化시켰다.

Section은 block을 30~50배의 實體顯微鏡을 이용 먼도날로 組織部位를 피라미드 모양으로 절단하여 LKB-Ultratome(Sorval MT-2)을 이용 다이아몬드 나

이프로 超薄切片(60~90 nm)을 만들어 100mesh의 grid에 올린 후 lead citrate와 uranyl acetate로 二重染色을 실시하였으며, 透過電子顯微鏡(Transmission Electron Microscope, Hitachi HU-11E型)으로 觀察하고 사진을 촬영하였다.

結果 및 考察

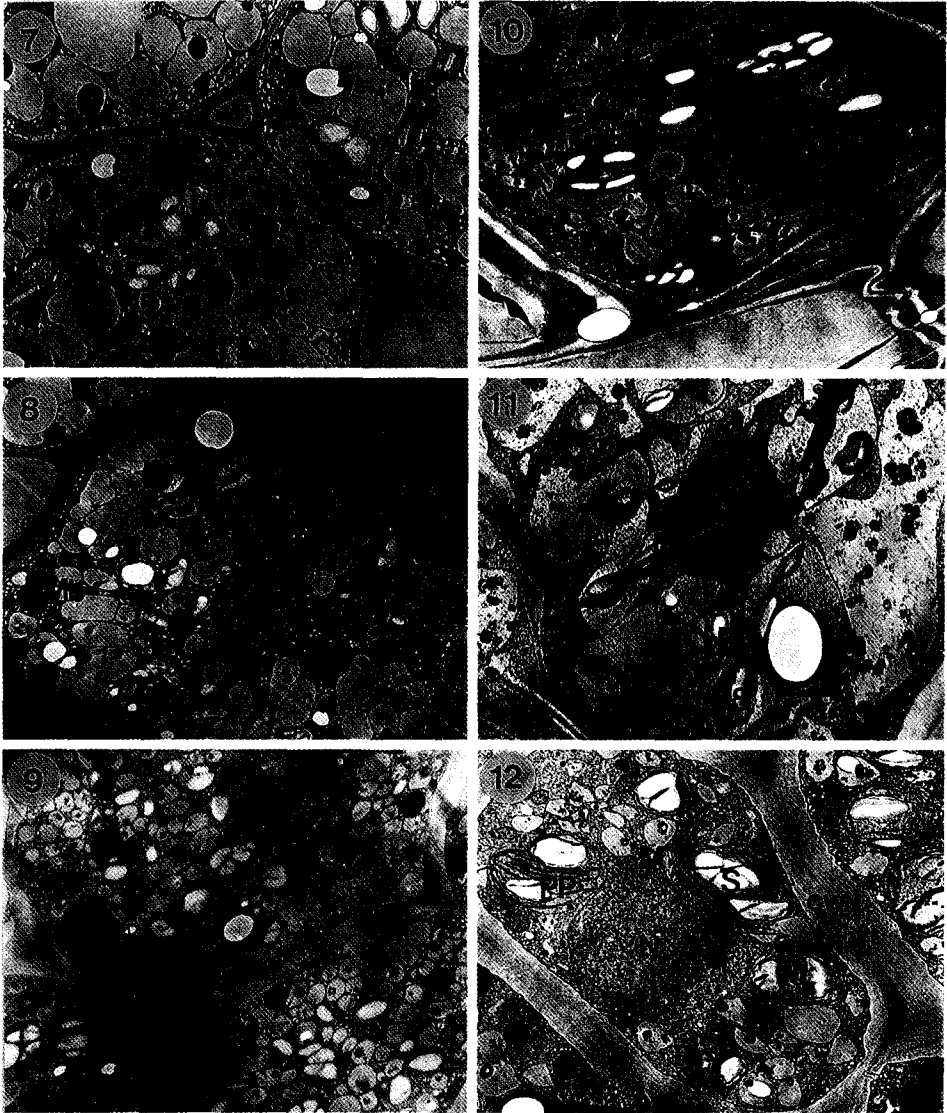
뽕나무 耐凍性과 관련하여 休眠期 및 發芽期 뽕나무 가지 皮層部의 細胞內 微細構造를 관찰한 결과 깊은 休眠에 들어가 있는 12월의 뽕나무 가지의 皮層



Figs. 1-6. Portions of cortical cells of ¹Kaeryangppong(x8,250), ²Shinilppong(x10,000) and ³Yongcheonppong(x9,240) in December. Almost all large starch granules(S) have disappeared from the plastids(P) in Fig. 1 but small starch granules are infrequently seen in Fig. 2 and 3. The cytoplasm is filled with small vacuoles(V), microbodies(Mb), mitochondria(M) and plastids. Plastids are located near the nucleus(N). Portions of cortical cells of ⁴Kaeryangppong(x10,000), ⁵Shinilppong(x8,250) and ⁶Yongcheonppong(x10,000) in January. Proplastids(PP) begin to appear in the cell in Fig. 6. The general appearance is the same as those of the cortical cells in December(Figs. 1-3). CW, cell wall.

細胞에는 澱粉이 거의 없는 plastids와 mitochondria가 核 주변에 觀察되었으며, 이 시기 耐凍性 증대를 위해 液胞는 소형화 되고 細胞內 microbody가 관찰되었다(그림 1-3). 그리고 液胞가 小形化되고 세포내에는 microbody 등의 微細構造들이 觀察되었으며, 가지 皮층부 내 거의 모든 澱粉粒들은 이 시기에 사라지고 신일뽕과 용천뽕에서는 드물게 관찰되었다. 이

러한 결과는 포플러 및 아카시아의 가지 皮層細胞의 微細構造變化와 비슷한 傾向을 보였는데(Sagisaka and Kuroda, 1991; Sagisaka *et al.*, 1989, 1990; 安, 1989; Asada *et al.*, 1988), 이 시기 기온이 내려감에 따라 耐凍性 증대를 위해 가지 皮層部 細胞內 微細器官이 변화되어 環境에 適應 가능한 상태로 再構成된 때문으로 생각된다. Sagisaka and Asada(1981), A-



Figs. 7-12. Portions of cortical cells of ¹⁴Caeryangppong(x12,000), ¹⁵Shinilppong(x6,600) and ¹⁶Yongcheonppong(x6,600) in February. The cytoplasm is filled with microbodies(Mb), mitochondria(M), plastids(P) and small vacuoles(V) which are fused to be bigger ones. Portions of cortical cells of ¹⁷Caeryangppong(x10,250), ¹⁸Shinilppong(x10,000) and ¹⁹Yongcheonppong(x10,000) in March. Fused vacuoles(V) are abundant and large starch granules(S) are frequently observed in the plastids(P). CW, cell wall; PP, proplastid; S, Starch granule.

sada *et al.*(1988), 安(1989)은 休眠期 포플러 皮層細胞를 電子顯微鏡 觀察한 결과 이 時期 포플러 皮層細胞內 微細構造들은 低溫 馴化를 위해 變化되어 生長期 거대한 液胞들이 소형화되고 澱粉粒 등이 消失되며 microbody, plastid 및 mitochondria 등이 관찰되었다고 하였다. 이와같이 뽕나무를 비롯한 溫帶性 樹木에서 越冬期 동안 細胞內 微細構造들의 變化는 거의 비슷한 傾向으로 생각된다.

그림 4-6은 개량뽕, 신일뽕 및 용천뽕의 1월중 가지 皮層部 세포의 微細構造를 觀察한 것으로서 이 시기에 核 주변에 plastid, mitochondria 및 소형의 液胞들이 관찰되었다. 특히, 이 시기 용천뽕의 가지 피층부 세포내에서는 proplastid가 관찰되었으며, 다른 품종들은 12월 중의 뽕나무 세포내 미세구조와 비슷한 경향을 보였다. Sagisaka *et al.*(1990), Sagisaka and Kuroda(1991)는 耐凍性이 증대되는 겨울동안 포플러 가지 皮層部 및 木質部 세포의 微細構造를 관찰한 결과 이 시기에 일본에서는 休眠이 打破되면서 이듬해 봄 生長을 위해 細胞內 微細構造들이 서서히 변화한다고 하였는데 뽕나무에서도 이러한 변화들이 관찰되었다.

그림 7-9는 2월중의 개량뽕, 신일뽕 및 용천뽕의 가지 皮層細胞의 미세구조들을 관찰한 것으로서 이 시기에는 休眠이 완전히 打破되어 液胞의 融合이 서서히 시작되어 대형화되고 休眠期 동안 소실되었던 澱粉粒이 서서히 세포의 plastid내에 형성되기 시작하였으며, proplastid와 같은 構造들이 관찰되어 이 시기부터 春期 發芽를 위한 細胞의 활동이 시작되는 것으로 생각된다.

그림 10-12는 개량뽕, 신일뽕 및 용천뽕의 3월 가지 皮層細胞로서 3월이 되면 기온이 상승함에 따라 세포내 dictyosomes, endoplasmic reticulum(Er), polysome 등의 수가 감소하며 microbody가 흐려지고 겨울동안 소실되었던 대형의 澱粉粒이 다시 plastids내에 많이 관찰되었다. 그리고 plastids의 分裂像이 관찰되었으며, plastids내의 二重膜을 가진 小包가 觀察되었다.

또한 12월 이후 월동 중의 뽕나무 가지 피층세포내 미세구조의 변화는 품종간에 큰 차이를 보이지 않았으며, 우리나라에서 기온이 가장 낮은 1~2월에 뽕나무 가지 皮層細胞內에는 mitochondria, plastids, microbody가 관찰되고 液胞가 소형화되어 있는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 安(1989)의 결과와 일치하며, 뽕나무의 경우 1월말 이후 또는 2월부터 休眠이 解除되고 耐凍性이 낮아짐에 따라 새로운 proplastid가 나타나고 細胞의 활동이 서서히 시작되어 細胞內 微細器官들이 변화되는 것으로 생각된다.

微細器官들이 변화되는 것으로 생각된다.

Quamme(1974)는 이 시기부터 溫帶性 植物은 耐凍性이 저하되고 果樹의 花芽 凍害는 이 시기에 많이 발생한다고 하였다. 또한 3월 이후 뽕나무 皮層細胞는 지금까지 소형화된 液胞가 融合되어 대형화가 시작되었다. 이 시기부터 액포는 細胞內에서 消化의 場으로서 役割을 한다고 하였는데(Matile, 1975), 이와 같이 뽕나무 가지 내 皮層細胞는 休眠 및 發芽期에 그 構造와 기능이 변화되어 環境條件에 알맞게 적절한 형태로 변화된다는 것은 매우 중요한 사실이라 생각된다.

이와 같은 결과는 뽕나무에서도 다른 木本植物과 같이 越冬을 하기위해서는 細胞內 構造의 변화가 일어나며, 低溫環境에 適應 가능한 形態로 細胞內 構造가 변화된다고 생각된다. 그리고 休眠이 解除되는 2월부터는 細胞의 活動이 시작되기 때문에 耐凍性이 낮아지고 이 時期에 갑작스런 低溫이 닥치면 凍害被害를 받기쉬운 때라 생각된다.

要 約

이 實驗은 내동성과 관련하여 休眠 및 休眠 解除期 細胞內 微細構造들의 變化를 알아보고자 개량뽕, 신일뽕, 용천뽕 등의 가지 皮層部를 채취하여 電子顯微鏡에 의한 細胞構造의 變化를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

12월중의 뽕나무 가지 皮層細胞는 液胞가 소형화되고 mitochondria, plastids가 核 주변에서 관찰되었고 plastids내 澱粉粒이 소실되었다.

1년중 기온이 가장 낮은 1~2월 뽕나무 가지 皮層細胞內 mitochondria, plastids 및 microbody 등이 觀察되었고 3월부터 기온이 상승함에 따라 뽕나무 가지 皮層細胞內 dictyosomes, polysomes 등의 수가 減少되며, 겨울동안 소실되었던 澱粉粒이 plastids내에 다시 形成되었다.

이상의 결과, 뽕나무의 경우 내동성이 증대되는 시기에 피층세포의 plastids 내 전분립이 소실되고 1월말 이후부터 休眠이 解除되고 耐凍性이 낮아짐에 따라 새로운 proplastid가 나타나고 細胞의 활동이 서서히 시작되어 細胞內 微細器官들이 변화되는 것으로 생각된다.

引用文獻

安永熙(1989) 高等植物의越冬と細胞內微小器官に關する研究. 北海道大學 博士學位論文, 日本.

- Asada, M., Y. H. Ahn and S. Sagisaka(1988) Changes in parenchyma cells of poplar xylem during transition from growing to wintering stages. *Plant Cell Physiol.*, **29**: 243~246.
- Fineran, B. A.(1971) Ultrastructure of vacuolar in root tips. *Protoplasma*, **72**: 1~18.
- Levitt, J. and G. W. Scarth(1936) Frost-hardening studies with living cells. II. Permeability in relation to frost resistance and the seasonal cycle. *Can. J. Res. C.*, **14**: 285~305.
- Matile, Ph.(1975) The lytic compartment of plant cell, In *Cell Biology Monographs*(M. Alfret *et al.*, eds.), Springer-Verlag. Wien, pp. 18~38.
- Matile, Ph. and H. Moore(1968) Vacuolation: Origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta*, **80**: 159~175.
- Niki, T. and A. Sakai(1981) Ultrastructural changes related to frost hardiness in the cortical parenchyma cells from mulberry twigs. *Plant Cell Physiol.*, **22**: 171~183.
- 大塚宏二(1972) クワ皮層細胞の春における耐凍性變動と細胞内微細構造變化, 低温科學. 生物篇, **30**: 33~44.
- Pomeroy, M. K. and D. Siminovitch(1971) Seasonal cytological changes in secondary phloem parenchyma cells in *Robinia pseudoaccacia* in relation to cold hardiness. *Can. J. Bot.*, **49**: 787~795.
- Quamme, H. A.(1974) An exothermic process involved in freezing injury to flower buds of several *Prunus* species. *J. Amer. Sci.*, **99**: 315~317.
- Sagisaka, S. and M. Asada(1981) Coordinate and noncoordinate changes in enzyme activities in pentose phosphate cycle in poplar: A control of enzyme activities in differentiated xylem. *Plant Cell Physiol.*, **22**: 1459~1468.
- Sagisaka, S., M. Asada, H. Kuroda(1989) Dormancy breaking is followed by mitochondria proliferation in poplar and apple trees in milieu of midwinter. *Plant Cell Physiol.*, **30**: 79~84.
- Sagisaka, S., M. Asada and Y. H. Ahn(1990) Ultrastructure of poplar cortical cells during the transition from growing to wintering stages and vice versa. *Trees*, **4**: 120~127.
- Sagisaka, S. and H. Kuroda(1991) Changes in the ultrastructure of plastids after breaking of dormancy in perennials. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 1671~1673.
- 酒井 昭(1956) 植物における耐凍性増大と外圍溫度. 低温科學, 生物篇, **14**: 7~15.
- 酒井 昭(1972) 植物の寒害と耐凍性, 1968年以前の研究論文リスト. 雪永, **34**: 44~53.
- 酒井 昭(1982) 植物の耐凍性と寒冷適應-冬の生理. 生態學-, 學會出版センタ, 東京, pp. 469.
- Srivastava, L. M.(1966) On the fine structure of the cambium of *Fraxinus americana* L.. *J. Cell Biol.*, **31**: 79~93.
- Villers, T. A.(1971) Lysosomal activities of the vacuole in damage and recovering plant cells. *Nature New Biol.*, **233**: 57~58.