

## Peace 포플러의 기내 배양시 발생하는 과수화 식물체의 조직적 특성

강효진<sup>1</sup>, 문흥규<sup>1\*</sup>, 박소영<sup>1</sup>, 김판기<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>국립산림과학원 생물공학과, <sup>2</sup>서울대학교 기초과학연구원

### Anatomical Characteristics of Hyperhydric Shoots Occuring in *In Vitro* Culture of Peace Poplar

Hyo-Jin Kang<sup>1</sup>, Heung-Kyu Moon<sup>1\*</sup>, So-Young Park<sup>1</sup>, Pan-Gi Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Biotechnology, Forestry Research Institute (KFRI), Suwon, Omokdong 44-3, Gyonggido 441-350, Korea

<sup>2</sup>Research Institute of Basic Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**ABSTRACT** We investigated the anatomical aspects of vitrification in peace poplar. Comparisons were made with regard to characteristics occurring between hyperhydric and normal shoots in shoot proliferation cultures on MS medium containing 0.2 mg/L BA. Compared with normal plants, hyperhydric plants had thick, curled, and dark green leaves. Hyperhydric stems were thicker and shorter than those of normal stems. When examined under the microscopes, the mesophyll palisade cells of hyperhydric leaves were vacuolated, whereas those of normal leaves contained normal and enriched vacuole with cytoplasm. Generally, the hyperhydric leaves showed poorly developed palisade parenchyma, and revealed irregular and bigger sized intercellular structures in both palisade and spongy parenchyma as well as epidermis cells compare to those of normal leaves. In addition, the hyperhydric leaves had lower stomatal density and bigger sized cell. Vascular tissues of hyperhydric stems were less differentiated because of poorly lignified xylem tissue. The greatly expanded cortical cells and pith appeared to be the main cause of thick stems as compared with normal stems.

**Key words:** Histology, hyperhydricity, *P. koreana* X *P. trichocarpa*, stomata

#### 서 론

Peace 포플러는 *Populus koreana*와 *Populus trichocarpa* 사이에서 자연적으로 생겨난 교잡종으로 기공이 광, CO<sub>2</sub>, 수분, O<sub>3</sub> 등의 환경변화에 민감하여 환경 및 생리학 연구의 중요한 수종으로 알려져 있으며 (Furukawa et al. 1990; Park et al. 1995; Ridolfi and Dreyer 1997), 최근에 Kang 등 (2004)은 이 수종을 재료로 형질전환을 통한 새로운 품종의 개발 가능성을 제시한 바 있다.

조직배양시 발생하는 과수화 현상은 카네이션, 안개초 등 몇몇 원예식물 및 목본식물의 대량번식에 있어서 발근,

순화율의 저조 등 생산성 저하의 주 원인으로 그 발생 원인을 구명하기 위한 생리, 생화학적 연구가 진행되었다 (Paek et al. 1991; Olmos et al. 1997; Ueno et al. 1998; Thomas et al. 2000; Kadota et al. 2001). 이러한 현상이 발생하는 요인에는 기내배양의 주된 환경 요소인 온도, 광도, 습도뿐만 아니라, 당, 배지내 무기물, 한천, 성장조절제 특히 사이토키닌의 첨가 등 여러 가지 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 밝혀져 있다 (Debergh et al. 1992). 최근에는 이러한 원인을 분석하여 해결함으로써 과수화 현상을 줄이는 실험이 이루어지고 있다 (Marga et al. 1997; Piqueras et al. 2002; Whitehouse et al. 2002; Kadota and Niimi 2003; Mayor et al. 2003). 조직학적 관찰은 과수화된 식물체의 특징을 비교적 쉽게 알 수 있는 방법으로 기공의 형태나 크기 변형, 잎에서 해면조직의 비대나 왁스

\*Corresponding author Tel 031-290-1163 Fax 031-290-1020  
E-mail hkmoon@foa.go.kr

층의 결핍 등이 카네이션, 가지, *Simmondsia chinensis* Schn. 등에서 관찰된 바 있다 (Olmos and Hellin 1998; Apostolo and Llorente 2000; Picoli et al. 2001).

본 실험은 아직 보고된 바 없는 peace 포플러의 조직배양 시 나타나는 과수화 된 싹을 정상 싹과 조직학적으로 비교 관찰 함으로써 peace 포플러의 기내 배양 특성에 대한 기초자료를 얻기 위해 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

국립산림과학원 생물공학과에서 기내배양하고 있는 peace 포플러를 마디 하나가 포함되도록 1~1.5 cm 길이로 절단하여 3% sucrose, 0.3% gelrite (Sigma) 처리된 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지, 혹은 MS배지에 BA 0.2 mg/L 을 첨가하여 싹 증식을 유도하였고 이 과정에서 정상적인 줄기와 과수화 된 줄기를 얻었다. 절편체는 배양병 당 4 점씩 치상하여 10반복으로 배양하였다. 배지는 멸균 전 pH 를 5.7로 조절하여 유리병 (6×11cm)에 30 ml씩 분주한 후 121°C에서 20분간 고압 멸균 하였다. 배양은 25±2°C로 유지되는 배양실에서 1일 16시간 40 μmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>의 광도로 명배양 하였다.

### 조직학적 관찰

해부적 특성 비교를 위해 과수화 된 싹과 정상 싹 두 가지로 구분하여 약 0.3×0.3cm 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde와 1.6% paraformaldehyde가 포함된 고정액에 24-48시간 동안 4°C에서 고정시켰다. 고정 후 에탄올로 탈수한 다음 Technovit 7100 (Kulzer, Germany)으로 침투, 포매하였다. 포매시킨 블록은 microtome (Leica RM 2165)을 이용하여 3 μm 크기로 잘라 슬라이드에 고정시켰다. 그리고 0.1% periodic acid과 Schiff 용액, 0.05% toluidine blue O로 염색 후, 광학현미경 (Leica DMR, Germany)으로 관찰하였다 (Yeung 1999). 줄기의 해부적 특성비교는 과수화 된 것과 정상적인 줄기의 절단 마디를 약 0.4 cm 크기로 절단하여 상기의 방법으로 관찰하였다. 한편 SEM (scanning electron microscopy)을 이용한 기공특성 조사를 위해 과수화 된 싹과 정상적인 싹을 약 0.5×0.5cm 크기로 잘라서 앞 뒷면이 위로 향하게 하여 stub에 고정시켰다. 다음 초저온 냉동고 (Ilshin DF9010, Korea)에서 3시간 동결한 후, 동결건조기에서 1시간 동안 건조시키고 ion spotter (Eiko IB-3, Japan)에 넣어 7 mA에서 5분간 gold로 코팅한 다음 주사전자현미경 (AKASI ABT 55, Japan)을 사용하여 500배와 1500배의 배율로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

배양 1주 후 액아로부터 shoot의 생장이 시작되었고, 2-3 주 후에는 BA 0.2 mg/L 첨가한 배지의 절편에서 다경이 유도되었다. 4주 후 유도된 shoot의 수는 절편 당 2.8개로 기본배지 보다 약 3배 정도 증식된 것으로 나타났다. 다경으로 증식되는 줄기의 약 10%는 과수화를 나타내었는데 이러한 줄기는 정상적인 줄기보다 절편 당 shoot 수가 많은 것으로 나타났다. 그러나 건중량으로 비교하였을 때 과수화 된 줄기는 정상적인 것보다 2배 정도 낮은 것으로 나타났다 (미제시 자료). 이러한 결과는 과수화된 shoot가 정상 식물에 비해 세포간극 내에 과다한 양의 수분을 보유하고 있었기 때문으로 추정되는데 과수화 된 감자 (Park et al. 2004)에서도 같은 결과가 보고된 바 있다. 형태적인 특징에 있어서도 과수화 된 싹이 정상 싹과 달리 두께가 두꺼우며, 진한 녹색을 띠고 가장자리가 거칠고 휘어져 있었다. 줄기의 형태에 있어서도 과수화 된 것은 직경이 정상 보다 두껍고, 길이가 짧은 경향을 보였다 (Figure 1). 과수화 된 식물에서 나타나는 이러한 형태적 변이는 기내배양이라는 특수환경에 의한 여러 효소의 활성 변화와 에틸렌 증가와 같은 대사 작용의 변화에 기인하는 것으로 알려져 있으며 (Chen and Ziv 2001), Debergh 등 (1992)은 식물체는 환경조건이나 배양기간에 따라 과수화 현상의 정도가 다르게 나타나지만, 대체적으로 잎은 두껍고 길며, 휘어져 있고 투명하면서 부서지기 쉽고 줄기는 직경이 크거나 작다고 하여 본 실험 결과와 유사한 관찰을 하였다.

주사전자현미경으로 잎의 표면을 관찰 하였을 때 (Figure 2), 기공 역시 과수화에 따라 서로 다른 특징을 보였다. 과수화 된 잎의 기공은 정상 잎에 비해서 크기가 컸고 그 주변을 둘러싸고 있는 세포는 비대하였으며 (Figure 2B, D, 4B), 기공은 모두 크게 open되어 있었다 (Figure 2B). 기공의 개폐는 공변세포와 공변세포를 둘러싸고 있는 주변세포의 협력과 삼투압의 차이로 이루어지는데 과수화 된 식물



**Figure 1.** Normal shoots (A) and hyperhydric shoots (B) in Peace poplar *in vitro*. Shoots were cultured on MS medium with 0.2 mg/L BA. Hyperhydric shoots (B) showing abnormal shoot multiplication.

체의 기공은 공변세포와 그 주변세포의 구조적인 변형으로 정상적 기능을 수행하지 못하여 계속 열려있는 것으로 추정된다. 한편 기공의 크기는 과수화 된 잎이 39.4  $\mu\text{m}$ 로 정상 잎과 비교해 60% 이상 큰 것으로 나타났으나 기공밀도는 정상 잎 (189.1개/ $\text{mm}^2$ )이 과수화 잎 (92.6개/ $\text{mm}^2$ ) 보다 2배 가량 높았다 (Figure 3). 비슷한 결과로 Olmos와 Hellin (1998)는 카네이션의 과수화 된 잎에서 기공밀도가 낮게 나타난 것은 정상 잎보다 2배 이상 커진 표피세포 때문이라고

관찰한 바 있다. 이렇게 과수화 된 잎은 기공이 정상적인 기능을 하지 못하기 때문에 기내식물의 순화 과정에서 생존을 저하의 주 원인이 되고, 왁스 층의 미발달과 광합성에 관여하는 책상조직의 발달 저하 역시 생존율을 낮추는 주된 요인이 된다 (Miguens et al. 1993). 한편 과수화 된 식물체의 잎은 광합성과 관련된 틸라코이드가 비정상적이며 그라나의 수도 적은 것으로 관찰된 바 있다 (Fontes et al. 1999).

이러한 형태적 차이에 영향을 미치는 조직학적 변화를 관찰하기 위해 과수화 된 식물과 정상 식물체의 잎과 줄기를 광학현미경 하에서 관찰하였다 (Figure 4). 전체적으로 과수화 된 잎은 정상 잎에 비해 두께가 두꺼웠는데 해부적 관찰 결과 이는 대부분의 엽육 세포들의 크기 및 세포 간극의 증가에 따른 것으로 생각된다. 정상적인 잎에서 표피층 세포들이 일정한 크기로 배열되어 있는 것과 달리 (Figure 4A) 과수화 된 잎은 대부분 비대해진 세포들로 불규칙하게 배열되어 있었다 (Figure 4B). 또 비대해진 세포들은 대부분이 정상 잎의 1.5배 정도 길이가 길었다 (Table 1). 책상

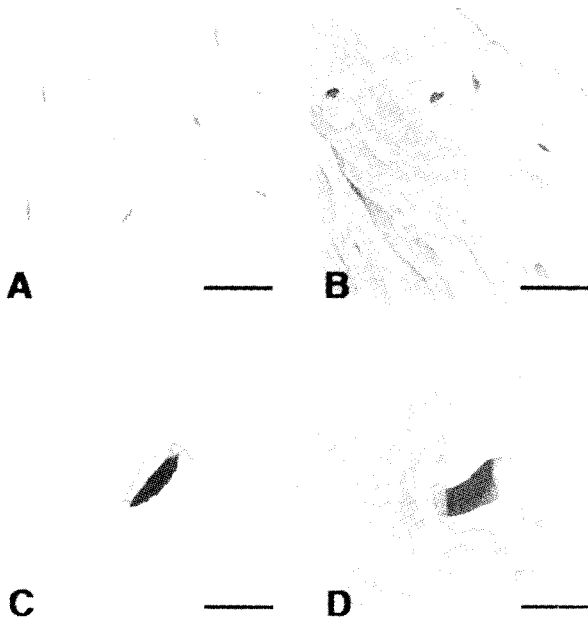


Figure 2. Scanning electron micrographs of stomata. (A), (C). - Stomata in normal leaves with well formed guard cells; (B), (D). - Stomata showing abnormal and bigger size guard cells in hyperhydric leaf. (A), (B) Bars = 40 $\mu\text{m}$ . (C), (D) Bars = 13.3 $\mu\text{m}$ .

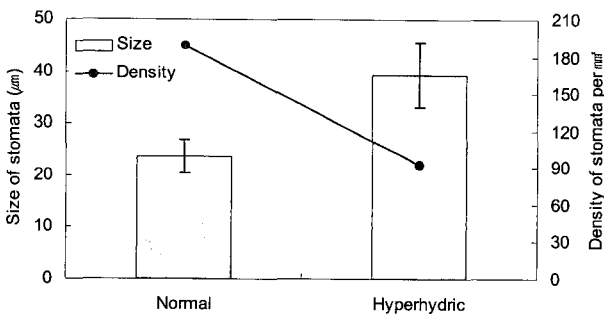


Figure 3. Size and density of stomata in normal and hyperhydric leaves. Stomata density was calculated as the number of stomata per  $\text{mm}^2$ .

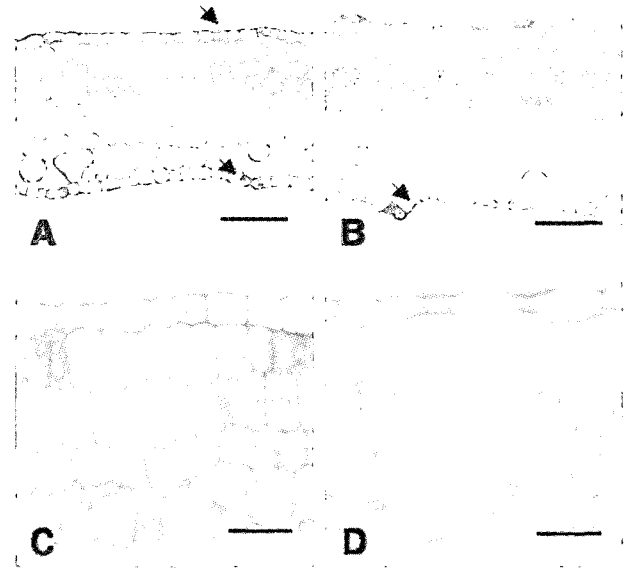


Figure 4. Transverse sections of normal (A), (C) and hyperhydric leaves (B), (D) stained by 0.05% TBO. (A), (B) bars = 50 $\mu\text{m}$ . (A) Arrow indicates cuticle layer and normal subsidiary cell. (B) Arrow indicates abnormal subsidiary cell. Well arranged palisade cells in normal leaf (C) and vacuolated cells in hyperhydric leaf (D). bars = 20 $\mu\text{m}$ .

Table 1. Quantitative analysis morphologic data from normal and hyperhydric leaves of Peace poplar.

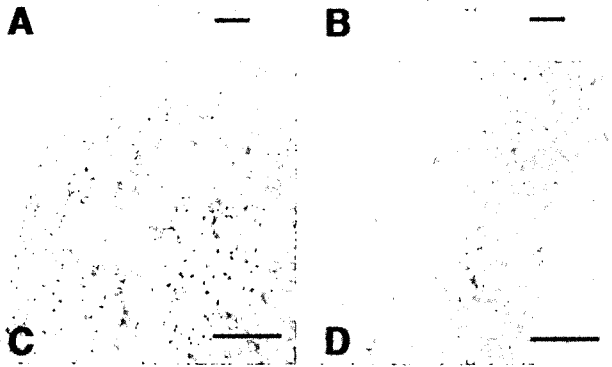
	Epidermis		Palisade		Spongy
	Width ( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>	Length ( $\mu\text{m}$ )	Width ( $\mu\text{m}$ )	Length ( $\mu\text{m}$ )	Area ( $\mu\text{m}^2$ )
Normal	14.1 ± 3.6	10.7 ± 1.5	11.1 ± 2.1	20.9 ± 2.8	208.3 ± 71.9
Hyperhydric	21.3 ± 7.2	11.7 ± 1.8	16.7 ± 4.5	27.5 ± 4.9	348.7 ± 125.2

<sup>2</sup> Mean values±SE from at least 10 separate preparations of normal and hyperhydric leaves are shown.

조직에 있어서도 정상 잎은 2~3개의 층으로 구성되어 있으나 과수화 된 잎은 1~2층으로 다소 층이 줄어든 것을 볼 수 있었다 (Figure 4). 조직의 세포 형태에 있어서도 과수화 된 잎은 불규칙하면서 세포간극이 컸으며 세포 크기도 폭, 높이 각각 16.7  $\mu\text{m}$ , 27.5  $\mu\text{m}$ 로 정상 잎의 11.1  $\mu\text{m}$ , 20.9  $\mu\text{m}$  보다 컸다 (Table 1). 그리고 과수화 된 세포는 액포화 되어 있는 반면에 (Figure 4D) 정상 잎의 세포들은 간극 없이 치밀하게 배열되어 있었으며 세포질이 충만한 것으로 나타났다 (Figure 4C). 과수화 된 해면조직의 세포 크기는 348.7  $\mu\text{m}^2$ 로 정상 잎의 208.3  $\mu\text{m}^2$  보다 약 1.7배를 보였고, 세포간극 또한 훨씬 크게 나타났다. Olmos와 Hellin (1998)는 과수화 된 카네이션의 잎 조직에서 책상조직은 없었고 해면조직만을 관찰 할 수 있었다고 하였는데 이 같은 결과는 과수화의 여부에 따라 잎의 구조적 특징이 심하게 변형되어 있음을 단적으로 보여주는 결과이다.

한편 잎에서 관찰된 해부적 특성 차이는 줄기에 있어서도 유사하게 관찰되었다. 과수화 된 줄기는 정상적인 것보다

직경이 약 2.5배 큰 것으로 나타났고 피층, 수 (pith)를 포함하여 전체적으로 정상적인 줄기처럼 원형이 아닌 불규칙한 형태를 보였다 (Figure 5A, B). 정상줄기는 피층의 넓이가 595  $\mu\text{m}^2$ 인데 반해 과수화 된 줄기는 이 보다 3배 정도 (1746.8  $\mu\text{m}^2$ ) 크고, 수 (pith)의 넓이도 정상 줄기 (83.5  $\mu\text{m}^2$ ) 에 비해 3배 (253.5  $\mu\text{m}^2$ ) 정도 컸다 (Table 2). 일반적으로 목부와 사부사이의 형성층은 목질화 된 2차 목부로 인해 구별되지만 과수화 된 줄기는 2차 목부가 목질화 발달이 저조하여 구별이 어려웠다 (Figure 5C, D). 카네이션과 가지의 과수화 된 줄기에서도 형성층의 구별이 어려운 것으로 보고 된바 있다 (Majada et al. 2000; Edgard et al. 2001). 과수화 된 식물체의 조직학적 차이에 의한 형태적 변화는 기내 식물체의 발근, 순화 등 정상적 생장에 저해요인이 되고 있어 기내환경 조절과 생장억제제의 첨가 등 이러한 현상을 극복하기 위한 연구가 수행된 바 있다 (Gribble 1999; Chen and Ziv 2001). 한편 peace 포플러에서는 줄기의 기내증식 과정에서 약 10% 정도만이 과수화를 나타내 증식상의 큰 문제로는 나타나지 않았지만 대량증식을 목적으로 조직배양이 실시된다면 기내환경의 조절이 요구된다. 본 실험에서 관찰한 peace 포플러의 정상 식물체와 과수화 식물체 간의 형태, 해부적인 차이 비교는 다른 포플러류의 효율적인 기내 배양을 위한 기초 자료는 물론 목본 수종의 조직 배양에서 흔히 관찰되는 과수화 현상의 형태, 해부학적 특성 이해에 도움이 되리라 생각된다.



**Figure 5.** Transverse sections of normal (A, C) and hyperhydric stems (B, D) stained by 0.05% TBO. Comparison of normal stem (A) with hyperhydric stem (B) in size. (A), (B) bar = 200  $\mu\text{m}$ . Cortical cells and pith were larger in hyperhydric stem (D) than in normal stem (C). (C), (D) bar = 50  $\mu\text{m}$ .

**Table 2.** Quantitative analysis morphologic data from normal and hyperhydric stems of Peace poplar.

Stem	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	
	Cortical	Pith
Normal	594.95 ± 186.44 <sup>z</sup>	83540.17 ± 7264.90
Hyperhydric	1746.77 ± 426.59	253514.11 ± 10792.50

<sup>z</sup> Mean values±SE from at least 10 separate preparations of normal and hyperhydric stems are shown.

## 적 요

목본류 생리학 연구에 있어서 중요한 수종인 Peace 포플러의 기초 연구자료를 얻고자 본 실험을 실시 하였다. 액아마디를 BA 0.2 mg/L 처리된 MS 배지에 배양하여 shoot의 증식시 나타나는 과수화 된 shoot를 정상 shoot와 비교하였다. 과수화 된 shoot는 진한 녹색을 띠고, 잎은 두껍고 휘어져 있으며 투명하였다. 또 줄기는 정상적인 줄기보다 두껍고 길이가 짧았다. 조직학적 관찰 결과 과수화 된 잎은 책상조직의 발달이 부진하였으며 정상적인 잎에 비하여 책상조직과 해면조직 그리고 표피 세포 모두 불규칙하고 세포간극의 크기가 큰 것으로 나타났다. 또한 과수화 된 잎의 기공은 크기가 커서 단위면적 당 밀도가 낮았으며 공변세포와 그 주변 세포들이 변형되어 있었다. 과수화된 shoot의 직경은 정상적인 것보다 큰 것으로 나타났는데 이것은 피층과 수층 세포의 비대에 따른 것으로 관찰되었다. 한편 과수화 된 줄기는 정상 줄기에 비해 목질화 발달이 미약하여 형성층 구별이 어려웠다.

## 인용문헌

- Apostolo NM, Llorente BE (2000) Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. In Vitro Cell Dev Biol Plant 36: 243-249
- Chen J, Ziv M (2001) The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured *Narcissus*. Plant Cell Rep 20: 22-27
- Debergh P, Aiken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992) Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. Plant Cell Tiss Org Cult 30: 135-140
- Edgard ATP, Wagner CO, Maira LF, Sonia MBC, Raul SA, Eldo AMS, Carlos RC, Elizabeth PBF (2001) Hyperhydric in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). Plant Sci 160: 857-868
- Fontes MA, Otoni WC, Carolino SMB, Brommconschenkel SH, Fontes EPB, Fari M, Louro RP (1999) Hyperhydricity in pepper plants regeneration *in vitro*: Involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. Plant Cell Rep 19: 81-87
- Furukawa A, Park SY, Fujinuma Y (1990) Hybrid poplar stomata unresponsive to changes in environmental conditions. Trees 4: 191-197
- Gribble K (1999) The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. Plant Growth Rep 27: 179-188
- Kadota M, Imizu K, Hirano T (2001) Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. Scientia Hort 89: 207-215
- Kang HD, Moon HK, Park IS, Lee MS (2004) Effect of TDZ on shoot proliferation of Peace poplar. Korean J Plant Biotech. 31: 49-53
- Majada JP, Tadeo F, Fal MA, Sanchez-Tames R (2000) Impact of culture vessel ventilation on the anatomy morphology of micropropagation carnation. Plant Cell Tiss Org Cult 63: 207-214
- Marga F, Vebret L, Morvan H (1997) Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. Plant Cell Tiss Org Cult 49: 1-5
- Kadota M, Niimi Y (2003) Effects of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. Plant Cell Tiss Org Cult 72: 261-265
- Mayor ML, Nestares G, Zorzoli R, Picardi LA (2003) Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. Plant Cell Tiss Org Cult 72: 99-103
- Miguens FC, Louro RP, Machado RD (1993) A scanning electron microscope study of normal and vitrified leaves from *Datura innoxiosa* plantlets cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss Org Cult 32: 109-113
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
- Olmos E, Hellin E (1998) Ultrastructural difference of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. Scientia Hort 75: 91-101
- Olmos E, Piqueras A, Martinez-Solano JR, Hellin E (1997) The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. Plant Sci 130: 97-105
- Paek KY, Han BH, Choi SL (1991) Physiological, biochemical and morphological characteristics of vitrified shoots regenerated *in vitro*. Kor J Plant Tiss Cult 18: 151-162
- Park SY, Furukawa A, Totsuka T (1995) Effect of CO<sub>2</sub> enrichment on growth of two poplar clones, I-214 (*Populus euramericana*) and Peace (*P. koreana* X *P. trichocarpa*). Kor J Ecol 18: 255-263
- Piqueras A, Cortina M, Serna MD, Casas JL (2002) Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. Plant Sci 162: 671-678
- Park SW, Jeon JH, Kim HS, Park YM, Aswath C, Joung H (2004) Effect of sealed and vented gaseous micro environments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. Scientia Hort 99: 199-205
- Ridolfi M, Dreyer E (1997) Responses to water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koreana* X *trichocarpa* cv. Peace). New Phytol 135: 31-40
- Thomas P, Mythili JB, Shivashankara KS (2000) Explant, medium and vessel aeration affect the incidence hyperhydricity and recovery of normal plantlets in triploid watermelon. J Horti Sci Biotech 75: 19-25
- Ueno K, Cheplick S, Shetty K (1998) Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano. Process Biochem 33: 441-445
- Whitehouse AB, Marks TR, Edwards GA (2002) Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. Plant Cell Tiss Org Cult 71: 245-252
- Yeung EC (1999) The use of histology in the study of plant tissue culture systems - some practical comments. In Vitro Cell Dev Biol Plant 35: 137-143

(접수일자 2004년 2월 17일, 수리일자 2004년 6월 19일)