

가속기 X선 영상기법을 이용한 애기장대 뿌리털의 물 흡수과정 가시화

황배근* · 김혜구** · 이상준†

Visualization of Water-uptake Process in Excised Roots of Arabidopsis using Synchrotron X-ray Imaging Technique

Bae Geun Hwang, Hae Koo Kim and Sang Joon Lee

Abstract. Water-uptake through roots, is an essential process of the water flow in plants. Its visualization is very useful for understanding sap flow dynamics at whole plant level. In this study, the tips of Arabidopsis' root hairs were excised and exposed to repeated dehydration and rehydration processes. The water-refilling through individual xylem vessels was visualized using the synchrotron X-ray micro-imaging technique. The high temporal resolution (2 μm) and beam intensity of the X-ray source allowed to acquisition of consecutive X-ray images of the water-refilling process up to 10 frames/sec. Various flow patterns were observed and the ascending speed of the water-air interfaces was analyzed. The relation between the water-rising height and ascending speed was also analyzed. The present results would provide better alternative for investigating sap flows in roots.

Key Words: Synchrotron X-ray(가속기 X-선), Arabidopsis(애기장대), Root hair(뿌리털), Xylem vessel(물관)

1. 서 론

식물의 뿌리를 통한 물 흡수는 증산 작용(transpiration)을 비롯한 식물 생리활동의 기초가 되며, 광물성 영양분을 흡수하는 과정이기도 하다. 이 과정에서 연간 지표수 증발량의 약 70%가 흡수되며¹⁾, 농업 생산과 기후 변화에도 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 현재 널리 받아들여지고 있는 cohesion-tension 이론에 의하면 뿌리를 통한 물의 흡수와 잎까지의 수액 이동은 잎에서 발생하는 증산 작용에 기인하며, 물 분자간의 인력으로 물관(xylem vessel)을 통해 뿌리까지 전달되어진다. 고등 식물은 물관의 기능을 유지/향상시키기 위해 그 내부에 천공판(perforation plate), 벽공막(pit membrane)과 같은 복잡한 구조를 발전시켜왔다. 음압에 대한 물관 회로의 유체역학적인 반응은 전기회

로의 옴의 법칙(Ohm's law)과 유사하게 유체역학적 저항(hydraulic resistance) 개념으로 해석될 수 있는데, 물관의 해부학적인 구조가 이러한 유체역학적 특성에 크게 영향을 미치며, 식물의 종은 물론 각 개체의 생장 과정에 따라서 그 영향이 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다²⁾.

그러나 식물 뿌리 내부 생체 유동을 제대로 가시화하기에는 여러가지 어려움이 따른다. 절개하지 않은 일반적인 상태의 식물 조직은 대체로 불투명하고, 특히 뿌리는 토양 내부에 위치해 있다. 또한 물관 내부의 해부학적 구조를 식별해내기 위해서는 수 μm 이하의 공간해상도가 요구되며, 이를 위해서는 얇게 절개한 조직을 염색 혹은 고정(fixation) 시키는 등 복잡한 처리 과정을 거쳐 샘플을 만들고 고배율 광학 현미경 혹은 전자주사현미경(scanning electron microscopy) 등의 영상 기법으로 관찰하여야 한다. 그러나 in-vivo 상태에서 수액의 동적 거동을 함께 관찰하는 것은 어렵다. 관련된 이전 연구들을 살펴보면, 얇고 투명한 평판 형태로 만든 화분에 가시광선을 강하게 조명하여 토양의 수분 함량 변화를 가시화하고 근처의 뿌리가 물을 흡수하는

†POSTECH 기계공학과
E-mail : sjlee@postech.ac.kr

*POSTECH 기계공학과 대학원

**POSTECH 생물공학연구소

과정을 간접적으로 관찰하였다³⁾. 또한 자기공명영상장치(MRI)를 식물에 적용하여, 식물 내부의 수분분포와 수액 이동을 시간에 따라 가시화하기도 하였지만 공간해상도와 시간해상도가 낮아지는 문제점을 가지고 있다⁴⁾. 본 연구에서는 Lee와 Kim⁵⁻⁷⁾에 의해 개발된 가속기 X선 영상기법을 적용하였는데, 본 기법은 2 μm 이하의 우수한 공간 분해능으로 뿌리털 물관 내부구조를 고해상도로 관찰할 수 있고, 충분한 강도의 결맞음(coherent)을 가진 X선 광원을 사용하므로 10 fps 이상의 높은 시간 분해능으로 선명한 위상차(phase-contrast) 영상을 얻을 수 있다는 장점이 있어 식물 내부의 수액 거동을 가시화하는데 적합하다.

2. 실험장치 및 방법

2.1 방사광 가속기 X선 영상 빔라인

포항 가속기연구소(PAL)는 생체 샘플의 내부에 위치한 생체물질들의 동적 거동을 실시간으로 관찰할 수 있는 가시화 수단을 제공한다. 방사광 가속기를 광원으로 하는 X선은 높은 광속(photon flux)과 결맞음 특성을 가지고 있어 높은 시간 분해능으로 선명한 영상을 얻을 수 있다. 특히 광원의 결맞음 특성 때문에, 물과 공기처럼 굴절률이 다른 두 물질 사이의 계면에서 간섭이 일어나 경계가 뚜렷하게 나타나는 위상차(phase-contrast) 영상을 얻을 수 있는 큰 장점을 가지고 있다.

포항 가속기연구소의 1B2 와 7B2 빔라인에서 X선 영상 기법을 적용할 수 있다. 7B2 백색광원(whitebeam)

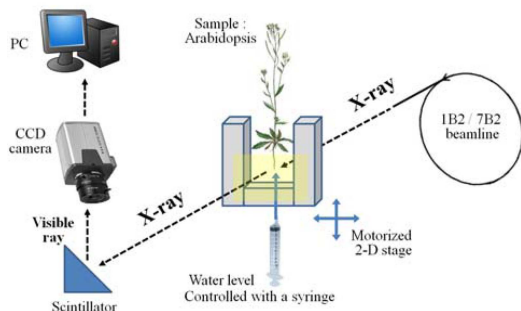


Fig. 1. Schematic diagram of synchrotron X-ray imaging technique. Coherent X-ray beam passes through the sample then converted into visible ray at the scintillator crystal.

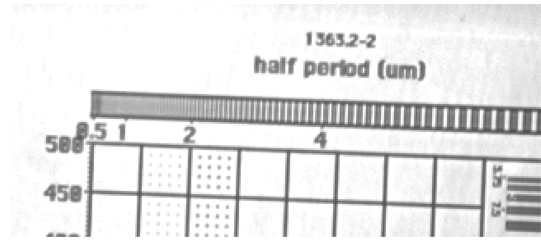


Fig. 2. X-ray image of a scale bar, showing the spatial resolution limit of the PAL 7B2 beamline. Contrast and brightness is enhanced.

은 10~30 keV 대역의 X선이 함께 섞여 나온다. 반면에 1B2 단색광원(moonbeam)은 단색화 장치(monochromator)를 거쳐 10 keV 단일 파장의 X선이 나오며 샘플에 가해지는 X선 피해가 적어 비교적 장시간 노출이 가능하다라는 장점이 있다.

가속기 X선은 샘플을 거쳐 scintillator 결정에서 가시광선으로 변환되며, 이를 현미경용 대물렌즈를 부착한 CCD 카메라로 촬영하였다(Fig. 1). 관측장(field of view)의 크기는 대물렌즈의 배율에 따라 결정된다. 다만 대물 렌즈의 배율을 높이더라도 X선 광원과 scintillator 결정의 표면 거칠기의 한계 등에 기인하여 본 실험의 공간분해능은 약 1~2 μm 수준이다(Fig. 2). 본 실험에서는 물-공기 계면의 상승 속도와 물관 내부 구조의 정밀도 등을 종합적으로 고려하여 10배율 대물 렌즈를 사용하였다.

2.2 샘플 처리 및 촬영

높이가 약 25~30 cm인 애기장대(Arabidopsis)를 식물 샘플로 선정하고 뿌리에 묻은 흙을 제거한 후 아크릴 지지대에 고정하였다. 아크릴 지지대에서 X선이 지나가는 부분은 투과율이 높은 케톤 테잎으로 만들고, 실험용 hutch 외부에서 원격 조종이 가능한 2차원 스테이지에 샘플을 고정하여 시간에 따라 상승하는 물-공기의 계면을 연속으로 관찰하였다. 이 때 지지대의 수직방향 높이를 스텝 모터로 조절하여 계면이 항상 카메라 촬영 범위 안에 위치 하도록 하였다. X선 입사중에도 식물 샘플에 물을 공급하고 제거하기 위해 역시 hutch 외부에서 통제 가능하도록 튜브를 syringe와 연결하였다. 지면에서 아래로 뿌리털의 길이가 약 1.5 cm인 것을 샘플로 선정하여 그 끝을 절개하고 공

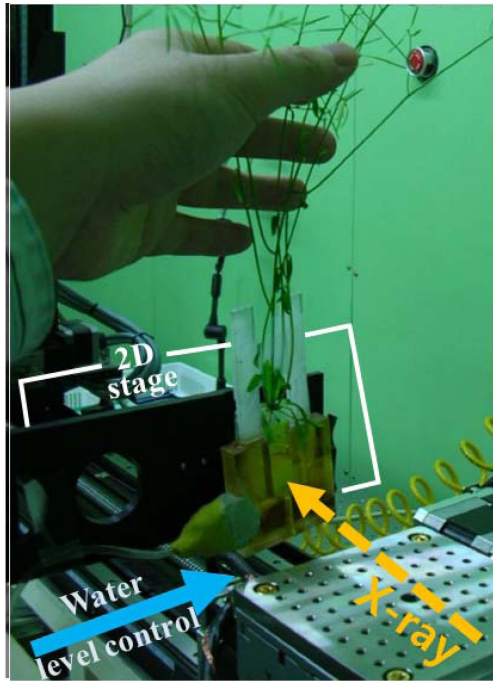


Fig. 3. Experimental setup established at PAL 7B2 beamline.

기 중에서 약 5분간 건조시킨 뒤 실험에 사용하였다. 절개된 뿌리 끝에 물을 공급하며 그 흡수 과정을 촬영하였고, 물을 빼고 다시 5분간 건조시킨 후 물을 재공급하며 촬영하는 과정을 반복하였으며, 물 흡수가 더 이상 일어나지 않는 것으로 판단되면 종료하였다. 촬영이 이루어지지 않는 동안에는 기계적 셔터를 닫아 생체 샘플이 X선에 직접 노출되는 시간을 최소화하도록 하였다.

Table 1은 두개의 빔라인에서 X선 영상 촬영 시 노출시간(exposure time)과 frame rate와 같은 실험 조건을 나타낸 것이다. 노출시간은 내부 구조와 물-공기 계면 등을 충분히 구별할 수 있을 만큼 선명한 X선 영상을 얻을 수 있는 최소한의 시간으로 설정하였다. 원래 7B2 백색광원 빔라인의 X선 강도가 1B2 단색광원 빔라인보다 높지만, 샘플에 미치는 X선 피해를 줄이기

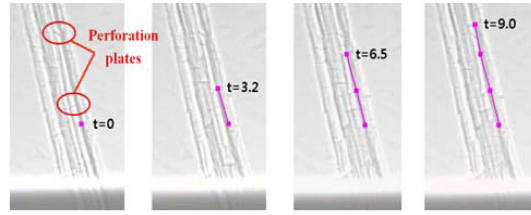


Fig. 4. Consecutive images of water refilling process of vessel#3, sample #4 in 2nd cycle.

위하여 두께가 1 mm인 알루미늄 판을 설치하여 에너지 강도를 10 keV 이하로 낮추었기 때문에, 노출 시간이 오히려 길어졌다.

3. 결 과

X선 영상 기법을 이용하여 애기장대 뿌리털 내부의 물관들과, 천공판(perforation plate)으로 추정되는 내부 구조물들의 위치, 각도 등에 대한 정보, 물-공기 계면의 거동을 실시간으로 가시화하였다(Fig. 4, 5). 물관의 직경은 8.57~22.8 μm 범위에서 고르게 분포하였다. 카메라로 취득한 원천 영상(raw image)에 대비(contrast) 강화, sharpening 등과 같은 영상처리기법을 적용하여 큰 직경의 물관에서는 내부 조직 구조들의 각도, 물-공기 계면들의 곡률, 물관 벽과의 접촉각 등에 관한 정보를 확인할 수 있었다.

건조 과정으로 인해 속이 빈 뿌리털 물관에 다시 물이 차 올라가는 과정은 물기둥 자체의 경계면과 상승하는 물-공기 계면에서 나타나는 명암(gray level) 차이로 확인할 수 있다. 특히 여러개의 물관들이 겹쳐 보이는 경우에는 물기둥 자체의 투과율로는 거의 구분하기 어렵지만, 물-공기 계면은 위상차(phase-contrast) 영상에서 강조되어 나타나므로 보다 용이하게 물관을 구분할 수 있다.

물-공기 계면의 중심 좌표가 움직이는 변위 벡터를 구하고 각각의 영상 사이의 시간 간격을 나누어줌으로써 물이 차 올라가는 속도를 계산하였다. 물-공기 계면

Table 1. Recording conditions

Sample	Beamline	CCD Camera	Pixels	Exposure	Frame rate	F.O.V
#1, #2	1B2	Redlake Megaplus II ES2001	1024×1024	30 msec	24 fps	735×735 μm
#3, #4	7B2	Vieworks VM-2M35	1600×1200	90 msec	10 fps	1013×795 μm

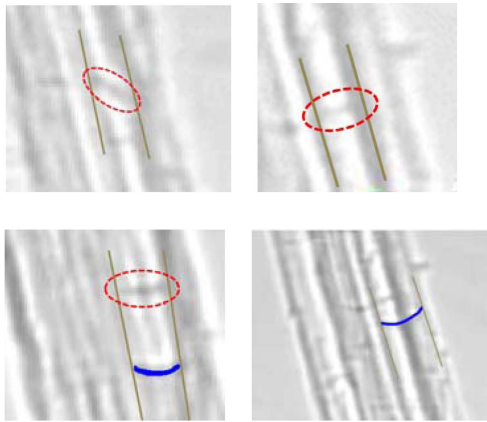


Fig. 5. Magnified perforation plates (highlighted with dotted lines) and air-water interfaces (solid lines). The curvatures and contact angles with nearby vessel walls are discernable in vessels of large diameter.

은 상승하는 도중에 천공판(perforation plate)으로 추정되는 물관 내부 구조물을 만나게 되면 일시적으로 감속하거나 일정 시간동안 상승을 멈추는 현상을 보여주었다.

상승하는 계면이 정지하게 되는 시간은 천공판의 구조와 위치에 따라 0.2sec ~ 28.4 sec으로 매우 다양하였으며, 대부분 (약 86%)의 경우 1.5 sec 이하의 짧은 시간 동안 정지하였다. 그러나 예외적인 몇몇 경우에

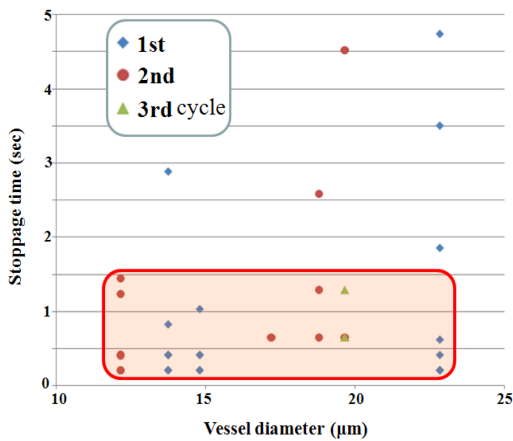


Fig. 6. Stoppage time at each perforation plate. Shaded box under 1.5 sec contains about 86% of cases. 6 cases that with a stoppage time longer than 10 sec are not depicted in this graph.

Table 2. Characteristic properties of individual xylem vessels in Arabidopsis' roots during water-uptake process.

Sample	Vessel diameter (µm)	Max.speed (µm/sec)	Average speed (µm/sec)	Mass flow rate (10 ¹² mL/sec)
#1	13.72	457.2	17.14	2.53
	16.43	15.68	10.03	2.13
	16.45	168.5	28.12	5.98
	22.48	144.8	13.8	5.48
	17.12	183.6	24.88	5.73
#2	13.34	236.4	136	19
	22.84	494.1	1.043	0.43
	14.78	90.2	20.02	3.44
	12.13	454.5	55.77	6.44
	8.57	57.15	17.69	1.02
	15.34	24.5	11.61	2.15
#3	19.6	293.9	23.19	7
	19.99	942.1	21.36	6.7
	21.56	100.3	35.08	12.8
#4	16.2	438.8	19.69	4.06
	18.79	141	29.13	8.08
	17.19	94.28	9.589	2.23
	19.65	94.28	18.56	5.63
	19.65	1345	77.76	23.6

는 10초 이상의 긴 시간 동안 상승을 억제하기도 하였다(Fig. 6). 물기둥이 천공판을 통과한 뒤에는 일시적으로 약 20~1300 µm/s의 속도까지 급격하게 가속되었다가 다시 감속되는 유동현상이 거의 모든 샘플에서 반복적으로 확인되었다.

Table 2는 취득한 영상들을 분석하여 얻어낸 정보들을 정리하여 나타낸 것이다. 이 중 상승한 물의 유량(mass flow rate)은 각 물관의 평균 직경과 평균 상승 속도로부터 계산한 값으로, 그 물관의 물흡수 성능을 나타낸다. Fig. 7은 물의 상승 속도와 올라온 물관의 길이 사이의 관계를 나타낸 것이다. 여기서 유속이 급격히 감속되어 y축(u=0)과 만나는 위치들을 확인한 결과 대체로 X선 영상에서 천공판과 같은 물관 구조물이 위치한 지점과 일치하는 것으로 나타났다.

4. 고찰 및 문제점

본 연구에서 관찰되어진 수액의 상승 거동은 벼, 옥

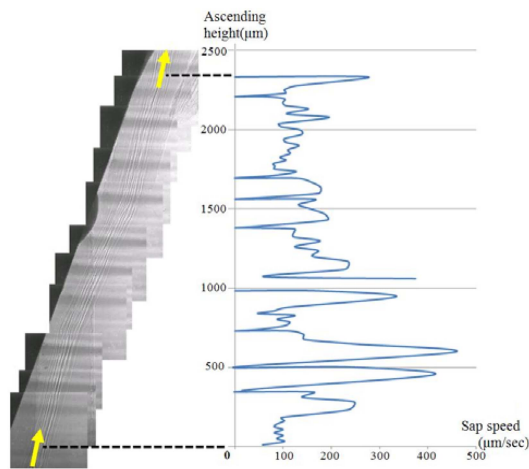
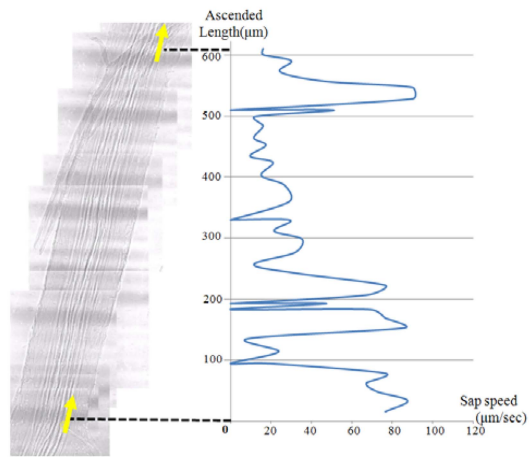
(a) vessel #1 of sample #2, in 2nd cycle.(b) vessel #3 of sample #2, in 1st cycle.

Fig. 7. Typical results of water-refilling processes. Left images are sectional X-ray image of the root hair right graphs the relation between the ascending length (μm) and the uprising speed ($\mu\text{m}/\text{sec}$) at the corresponding position of left image.

수수, 대나무 등 다른 종류의 식물의 잎, 줄기 등 다른 부위의 물관에서 나타난 결과들⁵⁻⁸⁾과 거의 유사하다. 이러한 유동 현상은 물관 내부에 작용하는 음압과 밀접하게 관련된 것으로 추정되며, 이런 현상을 제대로 규명하기 위해서는 물관 내부의 압력 변화에 대한 정보를 얻을 필요가 있다. 이를 위해서는 물의 재충진 과정에 대한 가시화 실험과 동시에 물관 내부 압력을 비파괴 방식으로 측정할 수 있는 방법을 개발하여야 한다.

SEM과 같은 전자현미경으로 천공판(perforation plate)을 관찰한 결과, 다공형, 층계형 등 다양한 형식의 구조가 존재하며 천공의 크기도 다양하였다. 상승하는 계면이 천공판을 통과할 때 작용하는 유체 저항은 이들의 형상과 각도에 따라 변한다⁹⁾. 본 실험에서 10 sec 이상의 긴 시간 동안 상승이 정지한 경우들은 천공판이 유체 저항으로 크게 작용한 것으로 보인다. 향후 연구에서는 강한 유체 저항으로 작용한 천공판 부위들에 대해 SEM 영상을 찍고 그 형상과 정지 시간 사이의 연관성을 조사할 필요가 있다. 또한 실험하는 동안 실내 온도($24\sim 25^\circ\text{C}$)와 광량은 일정하게 유지되었으나 습도는 정밀하게 통제되지 않았으며, 대체로 같은 깊이와 굵기를 가진 뿌리털을 선정하였으나 원뿌리(main root)에서 뻗어나온 곁뿌리(lateral root)의 밀도 등은 고려하지 못하였다. 따라서 많은 샘플들을 대상으로 체계적으로 반복 실험을 수행하여 상호 관련성을 확인할 필요가 있다.

본 실험에서는 X선 광원의 위상차 영상 기법을 활용하기 위하여 물관을 절개하여 인위적으로 생성시킨 물-공기 계면의 이동을 추적하였다. 그러나 건조와 재충전 과정을 반복하는 절개된 식물 샘플이 살아있는 식물 상태와 동일하다고는 할 수 없다. 실제 상황에서 in-vivo 실험 결과를 얻기 위해서는 식물 샘플의 절단/건조 과정 없이 살아있는 실제 생육 상태에서 물 이동을 가시화 할 수 있는 실험기법이 개발되어야 한다.

이러한 문제점에 대한 해법으로는 X선 영상에서 큰 흡수대비(absorption contrast)를 가지고 식물의 물관 내부의 유동에도 뛰어난 추종성을 가지는 금나노 입자와 같은 미세 입자를 추적 입자로 개발하고 이를 식물에 직접 투입하여 in vivo 조건에서 유동 정보를 추출하는 연구가 수행되어야 한다.

5. 결 론

가속기 X선 영상기법을 이용하여 애기장대 뿌리털 내부의 물관 구조와 물흡수 과정을 가시화하고 분석하였다. 뿌리털 내부의 해부학적 구조와 긴 물관을 따라 일어나는 물흡수 과정을 가시화하였으며, 천공판(perforation plate) 부위에서 일정 시간 정지하였다가 재가속하는 현상이 나타났다. 재가속 될 때의 속도는 약 $20 \mu\text{m}/\text{s}$ 에서 $1345 \mu\text{m}/\text{s}$ 사이에 분포하였다. 정지 시간과 재가속 속도는 샘플 종류와 반복 실험 횟수에

따라 매우 크게 변화하였으며, 심지어 같은 물관 내에서도 다양한 값을 가졌다. 이것은 물관의 내부 조직 구조의 다양성에서 기인한 것으로 추정된다.

후 기

이 논문은 교육과학기술부/한국연구재단 창의적 연구진흥사업(생체유동현상 규명 및 생체모방 연구)의 재원으로 수행되었으며, X-ray imaging 실험은 포항가속기연구소(PAL)의 1B2와 7B2 빔라인에서 수행되었습니다.

참고문헌

- 1) Caemmerer, S., Baker, N., 2007, "The Biology of Transpiration. From Guard Cells to Globe", *Plant Physiology*, Vol. 143, pp. 3
- 2) Steudle, E., Peterson, C., 1998, "Review Article: How does water get through roots?", *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49(322), pp. 775-788
- 3) Garrigues, E., Doussan, C., Pierret, A., 2006, "Water uptake by plant roots: I-formation and propagation of a water extraction", *Plant and Soil*, Vol. 283, pp. 83-98
- 4) Windt, C., Gerkema, E., As, H.V., 2009, "Most water in the tomato truss is imported through the xylem, not the phloem: A nuclear magnetic resonance flow imaging study", *Plant Physiology*, Vol. 151, pp. 830-842
- 5) Lee, S.J., Kim, Y.M., 2008, "In vivo visualization of the water-refilling process in xylem vessels using X-ray micro-imaging", *Annals of Botany*, Vol. 101, pp. 595-602
- 6) Lee, S.J., Kim, Y.M., 2003, "In vivo visualization of flow in xylem vessels of a bamboo leaf using synchrotron X-ray micro-imaging technique", *Journal of KSME B*, Vol. 27(11), pp. 1612-1617
- 7) Lee, S.J., Kim, G.B., Kim, S., Kim, Y.M., 2005, "Development of X-ray PIV technique and its application", *Journal of the Korean Society of Visualization*, Vol. 3(1), pp. 20-25
- 8) Kim, H.K., Lee, S.J., 2010, "Synchrotron X-ray imaging for nondestructive monitoring of sap flow dynamics through xylem vessel elements in rice leaves", *New Phytologist*, Vol. 188, Issue 4, pp. 1085-1098
- 9) Ellerby, D.J., Ennos, A.R., 1998, "Resistances to fluid flow of model xylem vessels with simple and scalariform perforation plates", *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49(323), pp. 929-985