

Research Report

돈나무의 내한성 평가 모델링

김인혜^{1,2}, 허근영^{1,2*}, 정현중¹, 최수민³, 박재현⁴¹경남과학기술대학교 조경학과²경남과학기술대학교 녹색기술연구소³국립산림과학원 남부산림자원연구소⁴경남과학기술대학교 산림자원학과Modeling Methodology for Cold Tolerance Assessment of *Pittosporum tobira*Inhea Kim^{1,2}, Keun Young Huh^{1,2*}, Hyun Jong Jung¹, Su Min Choi³, and Jae Hyoen Park⁴¹Department of Landscape Architecture, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea²Green Technology Institute, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea³Southern Forest Resources Research Center, Korea Forest Research Institute, Jinju 660-300, Korea⁴Department of Forest Resources, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

Abstract: This study was carried out to develop a simple, rapid and reliable assessment model to predict cold tolerance in *Pittosporum tobira*, a broad-leaved evergreen commonly used in the southern region of South Korea, which can minimize the possible experimental errors appeared in a electrolyte leakage test for cold tolerance assessment. The modeling procedure comprised of regrowth test and a electrolyte leakage test on the plants exposed to low temperature treatments. The lethal temperatures estimated from the methodological combinations of a electrolyte leakage test including tissue sampling, temperature treatment for potential electrical conductivity, and statistical analysis were compared to the results of the regrowth test. The highest temperature showing the survival rate lower than 50% obtained from the regrowth test was -10°C and the lethal was $-10^{\circ}\text{C}\sim-5^{\circ}\text{C}$. Based on the results of the regrowth test, several methodological combinations of electrolyte leakage tests were evaluated and the electrolyte leakage lethal temperatures estimated using leaf sample tissue and freeze-killing method were closest to the regrowth lethal temperature. Evaluating statistical analysis models, linear interpolation had a higher tendency to overestimate the cold tolerance than non-linear regression. Consequently, the optimal model for cold tolerance assessment of *P. tobira* is composed of evaluating electrolyte leakage from leaf sample tissue applying freeze-killing method for potential electrical conductivity and predicting lethal temperature through non-linear regression analysis.

Additional key words: broad-leaved evergreen, electrolyte leakage test, lethal temperature, linear interpolation, non-linear regression, regrowth test

서 언

기후변화에 대응하여 다양한 이용자의 요구에 부응하는 도시녹화용 조경수 개발이 필요하다. 겨울철 도시의 경관 향상과 생태적 건전성을 위해 상록식물의 활용이 증대할 것으로 예측되며(Kim et al., 2010), 한반도에 자생하는 상록활

엽수의 북방한계선 변화는 지구온난화로 인한 생육분포지 확대를 보여주고 있다(Lee et al., 2005; Park and Oh, 2002). 남부지역에 분포하는 상록활엽수 중 내한성이 강한 수종 또는 개체의 발굴을 통하여 중부지역에서의 도시녹화 활용 가능성을 평가할 필요가 있다. 그러나 상록활엽수의 내한성 평가에 관한 연구는 미흡한 실정이다(Shin, 2011).

*Corresponding author: sumoto@gntech.ac.kr

※ Received 18 March 2013; Revised 23 July 2013; Accepted 31 July 2013. 본 연구는 2012년 국립산림과학원 위탁연구과제 및 2013년 경남과학기술대학교 기성회 연구비 지원에 의해서 수행되었음.

© 2014 Korean Society for Horticultural Science

식물의 내한성 평가에는 전해질 용출법(electrolyte leakage method), TTC 환원법(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride reduction), 재생 검사(regrowth test) 등이 이용되어 왔다(Kim, 2006). 전해질 용출법은 온도 스트레스 시 세포막 투과성의 변화로 누출되는 전해질을 측정함으로써 세포의 열 안정성(thermo-stability)을 평가하는 방법으로 식물 조직 침출액의 전기전도도 측정값을 이용하여 비교적 짧은 시간에 간편하게 온도 스트레스에 대한 식물의 치사 온도를 예측할 수 있다. 전해질 용출법은 먼저 몇몇 식물의 내서성 평가에서 보고되었으며(Ingram, 1985; Ingram and Buchanan, 1981, 1984; Martineau et al., 1979), Ingram(1985)이 제안하였던 비선형회귀(nonlinear regression)를 통한 수리적 모델은 이후 여러 식물의 내한성 평가를 위한 연구들에 활용되었다(Anderson et al., 1988; Cardona et al., 1997; Kim, 2006; Kim et al., 2010; McKeller et al., 1992). 전해질 용출법을 통한 치사 온도의 예측은 비선형회귀뿐만 아니라 선형보간법(linear interpolation)을 통하여 산출되기도 하였으며(Ingram and Buchanan, 1981; Kim et al., 2003; Shashikumar and Nus, 1993; Shin et al., 2009), Bannister(2007)는 비선형회귀와 선형보간법이 유사한 저온 치사 온도값을 예측하였다고 보고하였다.

TTC 환원법은 살아있는 세포의 호흡에서 소모되는 산소를 환원제로 환원시켜 그 발색 정도를 평가하여 세포의 활력을 측정하는 방법으로(Steponkus and Lanphear, 1967) bermudagrass(*Cynodon dactylon* L.)의 저온 순화 측정(Shashikumar and Nus, 1993), 양배추의 결빙피해 분석(Manley and Hummel, 1996) 연구에 사용되었으며, 몇몇 선행 연구들에서 TTC 환원법이 전해질 용출법과 유사한 결과를 나타내었다고 보고하였다(Chun et al., 2000; Shashikumar and Nus, 1993). 재생 검사는 온도 스트레스 처리 후 식물의 재생을 검사하는 방법으로 Anderson et al.(1993)은 bermudagrass의 품종별 내한성 평가에 이 방법을 적용하였다. 또한 Anderson et al.(1988)을 포함하여 많은 선행연구들은 신뢰성 있는 내한성 평가와 평가 간의 적합성을 비교하기 위해서 2가지 이상의 방법을 동시에 적용하기도 하였다(Cardona et al., 1997; Iles and Agnew, 1995; Kim, 2006; Kim et al., 2010; Maier et al., 1994).

본 연구는 남부 지방에서 널리 사용되고 있는 상록활엽수인 돈나무의 내한성을 편리하고 신뢰성 있게 예측하는 평가 모델을 개발하고자 수행되었다. 전해질 용출법은 신속하고 간편한 내한성 평가 방법이 될 수 있지만, 식물의 내한성을 과대 평가하는 경향이 보고되었고(Anderson et al., 1988;

Cardona et al., 1997; Fry et al., 1993; Kim et al., 2010; Maier et al., 1994), 이것은 초본과 목본 식물의 차이, 전해질 용출 측정 대상 부위의 차이, 최대 전해질 용출 측정을 위한 온도처리 방법의 차이, 전해질 용출량을 통하여 저온 치사 온도를 예측하는 통계적 기법의 차이 등에 의한 실험방법 상의 오차에 의해서 발생할 수 있다고 추론된다(Anderson et al., 1988; Cardona et al., 1997; Dunn et al., 1999; Fry et al., 1993; Iles and Agnew, 1995; Maier et al., 1994). 반면 재생 검사는 전해질 용출법에 비하여 상대적으로 오랜 기간이 소요되지만 과대 또는 과소 평가가 일어날 수 있는 전해질 용출법의 단점을 보완할 수 있다고 보고되었다(Dunn et al., 1999). 따라서 본 연구에서는 재생 검사 결과 나타난 저온 치사 온도에 근거하여 전해질 용출법으로 도출된 저온 치사 예측 온도를 비교 분석하고 전해질 용출법에서 나타날 수 있는 실험방법 상의 오차를 조정함으로써 돈나무 내한성 평가에 적절한 모델을 도출함과 동시에 향후 남부 지역에 분포하는 상록활엽수들에 대한 중부 지역으로의 도입 가능성 검토 시 활용될 수 있는 보다 편리하고 신뢰성 있는 내한성 평가 모델링 방법을 제안하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료

장미목 돈나무과의 상록활엽관목인 돈나무(*Pittosporum tobira*(Thunb.) W.T. Aiton)는 잎이 짙은 녹색으로 광택이 있고 5-6월에 개화하는 황백색의 꽃은 향기가 강하여(Shin et al., 2006) 우리나라 남부 지방에서 관상수로 널리 사용되고 있다. 돈나무는 생장이 빠르고 수세가 강하며 내염성, 내병충해성, 내공해성 등 환경내성이 강한 생태적 특성을 가지고 있으므로(Shim et al., 1993) 상록활엽수의 내한성 평가 모델링을 위한 실험에 적합할 것으로 판단되어 식물 재료로 선정하였다. 본 실험에서는 경남 진주시에 위치한 남부산림연구소 묘포장 온실 내 직경 10cm × 높이 8cm의 포트에서 재배된 6년생 실생 모목 중 균일한 개체를 선발한 후 실험 재료로 사용하였다.

내한성 평가 모델링

내한성 평가 모델링은 식물체를 동일한 조건으로 인공적 저온처리를 한 후 재생검사와 전해질 용출법을 통한 치사 예측 온도를 상호 비교하는 방법으로 구성되었다(Fig. 1). 인

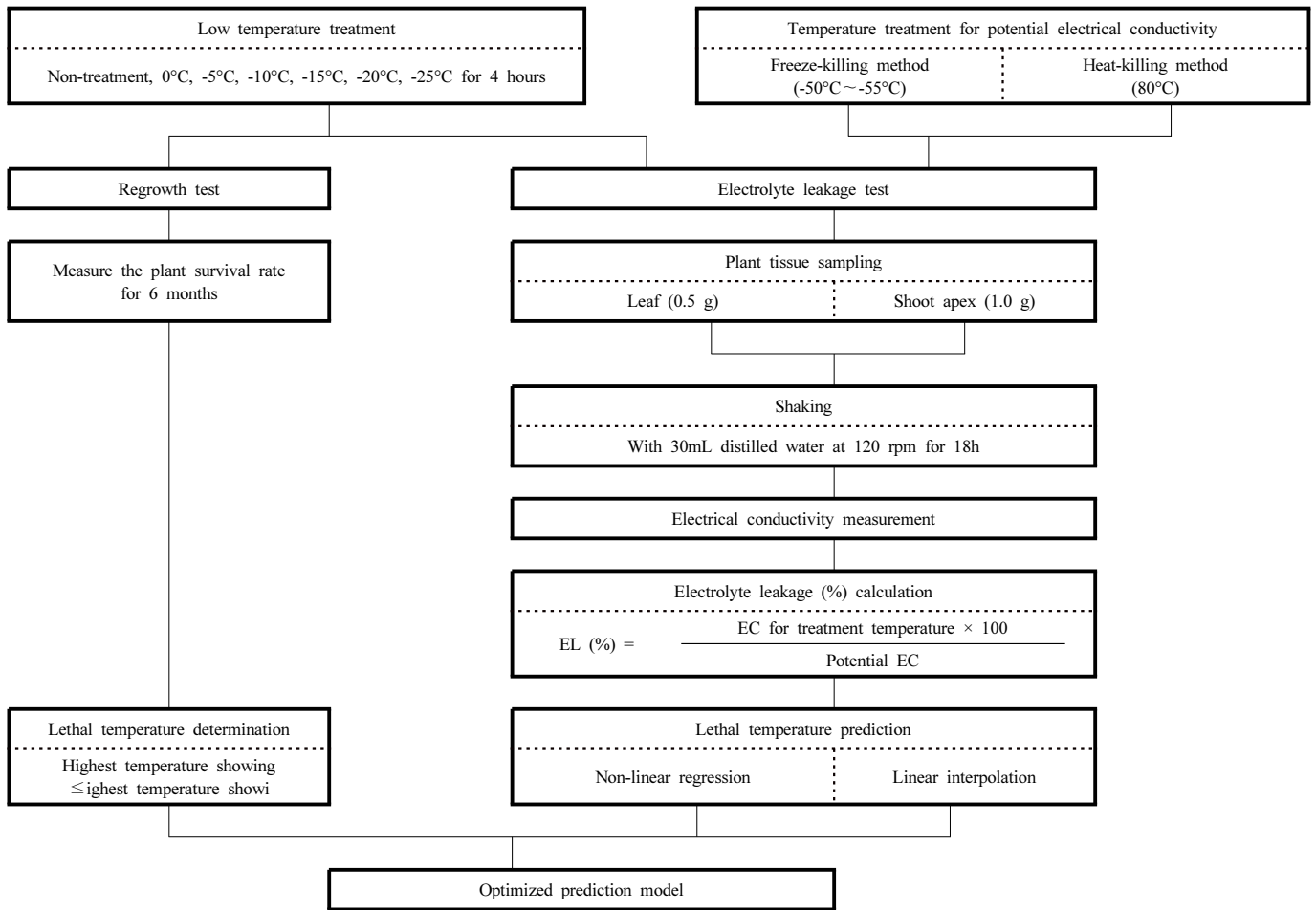


Fig. 1. Modeling process for cold tolerance assessment of *Pittosporum tobira*.

공적 저온처리는 2010년 12월 7일부터 12월 15일에 수행되었으며, 처리 온도는 식물체재료의 입수지를 비롯한 국내 대도시의 평균 최저온도를 고려하여 0°C, -5°C, -10°C, -15°C, -20°C, -25°C로 설정하였다. 관수 후 1주일이 경과한 사질양토 포트에 식재된 식물체들을 플라스틱 용기에 담고 펠라이트로 빈 공간을 채운 후에 냉각기(De-freezer: Refrigerant, Nihon Freezer Co., Ltd., Tokyo, Japan, 2003)에 넣고 4시간 동안 저온에 노출시킨 후 재생검사 및 전해질 용출 평가에 사용하였다(Anderson et al., 1988, 1993; Cardona et al., 1997; Iles and Agnew, 1995; Kim, 2006; Kim et al., 2010). 저온처리는 각각의 처리 온도에 따라 5반복으로 하였고 자료의 신뢰도를 높이기 위하여 -15°C와 -20°C에서는 10반복으로 하였다. 전해질 용출법에서 실험적 오차를 발생시킬 수 있는 요인을 전해질 용출 측정 대상 표본 조직, 최대 전해질 용출 측정을 위한 온도처리 방법, 저온 치사 온도를 예측

하는 통계적 기법으로 구분하고 이들의 조합으로 실험을 수행하였고, 각각의 방법 중에서 재생검사 결과와의 오차를 최소화할 수 있는 방법을 적정 평가 모델로 선발하였다.

재생 검사

재생 검사는 인공적으로 저온처리 된 식물체의 실제 생존율을 분석함으로써 신뢰성 있는 저온 치사 온도를 구명하고 전해질 용출 평가 실험 조합간의 비교를 위한 기준으로 활용하고자 수행되었다. 저온처리 후 식물체는 추가적인 저온 스트레스를 받지 않도록 10°C 이상이 유지되는 자연채광되는 실험실 내에서 관리되었다. 저온처리 후 약 2주 경과 시점인 2010년 12월 25일에 1차적으로 생존율을 측정한 후 약 6개월간 4회(2011년 2월 25일, 3월 25일, 5월 13일, 6월 28일)에 걸쳐 추가로 생존율을 측정하였다. 생존율 평가 시 식물이 살아있는 조직을 나타내거나 적어도 1개의 신초가 다

시 자라면 생존한 개체로 기록하였고, 생존율은 총 식물체 수에 대한 생존 개체수의 비를 백분율로 산출하는 방법으로 계산되었다. 전해질 용출 평가의 결과와 비교하기 위한 저온 치사 온도는 50% 미만의 생존율을 보이는 최고온도로 결정하였다(Anderson et al., 1993; Cardona et al., 1997; Maier et al., 1994).

전해질 용출 평가

식물체의 저온 치사 온도를 신속하게 예측할 수 있는 전해질 용출법은 평가모델의 신뢰성을 보다 향상시키기 위하여 선행연구에서 제시되었던 방법들(Anderson et al., 1988; Cardona et al., 1997; Iles and Agnew, 1995; Ingram, 1985; Ingram and Buchanan, 1981, 1984; Maier et al., 1994; Martineau et al., 1979; Shashikumar and Nus, 1993)을 종합적으로 검토하고 조정하여 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

전해질 용출량 측정을 위한 식물체 채취 부위에 따른 차이를 알아보기 위하여 인공적 저온처리를 한 식물체를 잎과 신초로 구분하고 식물체의 정단부에서 3-5번째의 성엽 0.5g과 신초 정단조직 1g을 각각 채취하여 표본조직으로 사용하였다. 채취된 표본조직은 50mL 용량의 마개가 있는 시험관에 30mL의 탈이온 2차 증류수(deionized double distilled water)와 함께 넣어 약 30분 동안 그대로 두었다가 진탕기(orbital shaker; NB-101M, N-Biotec, Inc., Bucheon, Korea, 2002)에서 120rpm으로 18시간 동안 진탕시켰다. 진탕 후 전도도측정기(conductivity meter; Orion 4-Star Plus meter, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA, 2008)를 사용하여 침출액의 전기전도도를 측정하였다. 또한 최대 전해질 용출량 측정법에 따른 차이를 살펴보기 위하여 최대 전해질 용출 측정을 위한 온도 처리 방법을 열치사법(heat-killing method)과 냉각치사법(freeze-killing method)으로 구분하고 무처리 상태의 식물체를 열치사법에서는 80°C의 건조기(CT-011, Taeyoung Electric Heater Co., Ltd., Bucheon, Korea)에서, 냉각치사법에서는 -50~-55°C의 냉각기에서 4시간 동안 처리한 후 위와 동일한 방법으로 표본을 채취하여 전기전도도를 측정하였다. 각 처리에 대한 전해질 용출값은 열치사법 또는 냉각치사법으로 식물체를 고사시킨 상태에서 전해질 용출량을 최대로 보았을 때, 이 상태의 식물 조직 침출액 전기전도도(potential electrical conductivity)에 대한 각각의 저온처리에 의해 유도된 식물 조직 침출액 전기전도도의 비를 백분율로 산출하는 방법으로 얻어졌다(Eq. 1).

Electrolyte leakage (%) =

$$\frac{\text{electrical conductivity for each treatment temperature}}{\text{potential electrical conductivity from freeze-killing or heat-killing method}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

저온 치사 온도를 예측하는 통계적 기법을 비교하기 위해서 비선형회귀 방법(nonlinear regression)과 선형보간법(linear interpolation)을 적용하여 저온 치사 온도를 산출하였다. 비선형회귀법은 처리 온도와 전해질 용출량의 관계에서 S자 곡선함수(Sigmoid function)를 구하기 위하여 많은 선행연구들에서 식물의 온도 저항성 평가에 적용하였던 분석법으로 본 연구에서는 Ingram(1985), Anderson et al.(1988), Cardona et al.(1997)이 제안하였던 비선형회귀식(Eq. 2)에서 변곡점(inflection point)에 해당하는 온도를 저온 치사 온도로 결정하였다. 선형보간법은 처리 온도와 전해질 용출량 관계에서 측정 구간별로 생성되는 직선 함수를 통하여 구간 사이의 값을 예측하는 가장 기초적인 형태의 분석법으로서 본 연구에서는 Ingram and Buchanan(1981), Kim et al.(2003), Shashikumar and Nus(1993), Shin et al.(2009)이 제안하였던 방법과 같이 전해질 용출이 50% 이상 나타나기 시작하는 지점의 온도를 저온 치사 온도로 결정하고 인접한 구간에서의 직선 함수식을 활용하여 산출하였다(Eq. 3). 두 가지 통계적 기법을 통하여 산출된 결과들을 재생 검사의 결과와 비교함으로써 최종적으로 가장 신뢰성 있는 내한성 예측 모델을 선발하였다.

$$EL_p = EL_{\min} + \frac{(EL_{\max} - EL_{\min})}{1 + e^{-k(T - T_m)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

EL_p = predicted electrolyte leakage(%)

EL_{\min} = lower bound of electrolyte leakage for non-treatment control(%)

EL_{\max} = upper bound of electrolyte leakage(%)

T_m = absolute value of temperature at the inflection point (°C)

k = function of slope at the inflection point

T = absolute value of treatment temperature(°C)

e = 2.718

$$LT_{50} = T_1 + \frac{T_h - T_l}{EL_h - EL_l} (50 - EL_l) \quad (\text{Eq. 3})$$

LT₅₀ = lethal temperature at which 50% electrolytes are lost(°C)
 EL_l = adjacent electrolyte leakage value lower than 50%(%)
 EL_h = adjacent electrolyte leakage value higher than 50%(%)
 T_l = treatment temperature at which EL_l was measured(°C)
 T_h = treatment temperature at which EL_h was measured (°C)

비선형회귀식의 최적 반응 곡선과 매개 변수는 Marquardt법을 이용한 비선형 최소제곱법(nonlinear least squares method)을 통하여 구하였으며 SAS 9.1.3 for Windows(SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, USA, 2006)의 PROC NLIN procedure를 통해 분석되었다.

결과 및 고찰

자료의 분석

측정된 자료는 SPSS 12.0.0 for Windows(SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2003)를 이용한 Duncan의 다중 검정법으로 평균간 차이의 유의성을 분석하였고 유의 수준은 5%로 하였다. 전해질 용출법에서 저온 치사 온도를 예측하기 위한

재생 검사에 의한 저온 치사 온도 예측

저온처리 후 약 2주 정도 경과된 시점에서 모든 처리 내 돈나무는 저온 피해를 나타내지 않았지만, 약 2개월 후인 2011년 2월부터 -15°C 이하의 저온처리들에서 모든 식물체

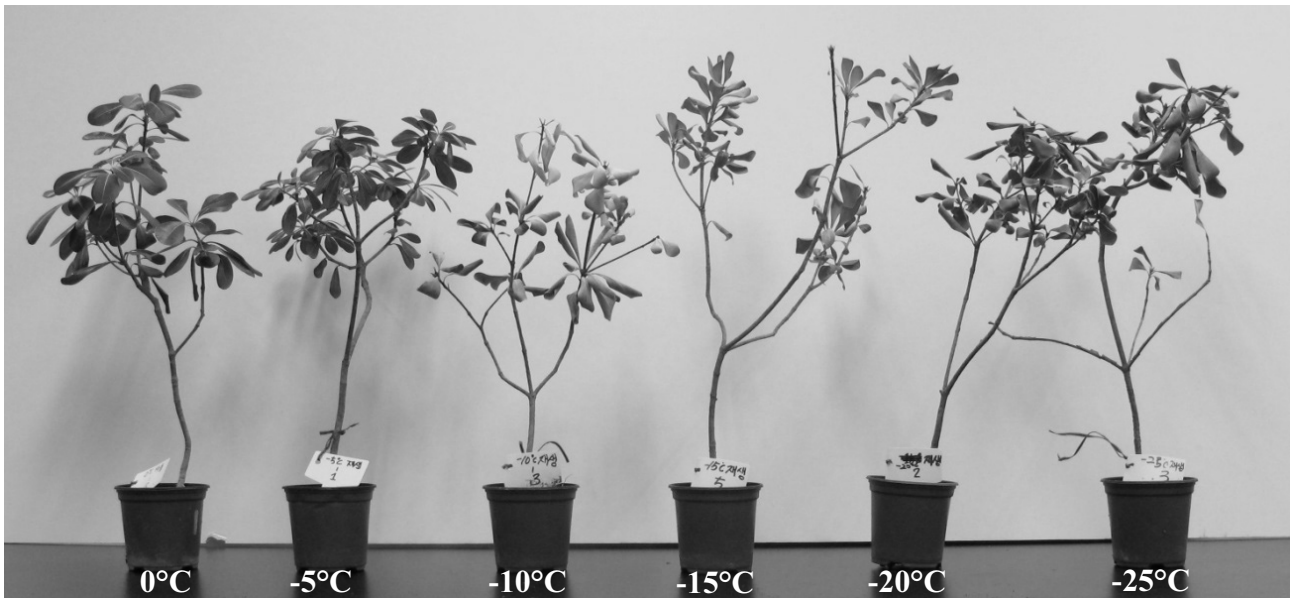


Fig. 2. Plant survival and regrowth quality of *Pittosporum tobira* maintained in day-lighted laboratory at over 10°C were evaluated on June 28, 2011, six months after low temperature treatments at 0°C, -5°C, -10°C, -15°C, -20°C, and -25°C for 4 hours. The plant treated below -10°C showed freeze-stressed/killed.

Table 1. Survival rate of *Pittosporum tobira* following low temperature treatments and regrowth test.

Treatment temperature (°C)	Survival rate (%) ^z				
	Dec. 25, 2010	Feb. 25, 2011	Mar. 25, 2011	May 13, 2011	June 28, 2011
0	100	100	80	80	80
-5	100	100	100	100	100
-10	100	60	20	20	20
-15	100	0	0	0	0
-20	100	0	0	0	0
-25	100	0	0	0	0

^zSurvival rate was calculated by (number of plants that survived after low temperature treatment/total no. of plants) × 100.

가 고사하였으며 약 3개월 경과 후에는 -10°C 처리에서도 현저한 생존율의 감소를 나타내었다(Table 1). 약 6개월간 재생 검사를 수행한 결과 돈나무는 0°C 와 -5°C 처리에서는 모두 80% 이상의 생존율로 안정적인 생육을 보였고 -10°C 이하의 저온처리부터 50% 미만의 생존율이 나타났다. 저온 처리 후 약 6개월이 경과한 시점인 2011년 6월에 식물의 회복 상태를 살펴보면 0°C 와 -5°C 처리에서는 지상부가 녹색을 유지하며 정상적으로 회복되었고 -10°C 이하의 저온처리에서는 지상부가 모두 고사한 것을 관찰할 수 있다(Fig. 2). 결과적으로, 재생검사를 통한 돈나무의 저온 치사 온도는 50% 미만의 생존율을 보이는 최고온도인 -10°C 와 50% 이상의 생존율을 보이는 최고온도인 -5°C 범위 내에 존재하는 것으로 분석되었다.

처리 온도별 전해질 용출량 비교

저온처리한 돈나무의 잎과 신초 정단에서 채취한 표본 조직에서의 전해질 용출량을 측정한 결과 전반적으로 처리 온도가 낮아질수록 전해질 용출량이 증가하였으며 -10°C 부터 -15°C 사이에서 급격한 증가를 보이다가 그 이하의 온도에서는 전해질 용출량이 감소하거나 일정 수준으로 유지되는 경향을 보였다(Table 2). 잎에서는 냉각치사법 및 열치사법 모두에서 -15°C 부터 50% 이상의 전해질 용출이 나타났고 이것을 -10°C 이상에서의 전해질 용출량과 비교했을 때 유의성 있는 차이를 보였으므로 저온 치사 온도는 -10°C 와 -15°C 사이에서 나타날 것으로 예측되었다. 신초 정단에서는 냉각치사법을 이용했을 경우 잎과 유사하게 -15°C 에서

50% 이상의 전해질 용출이 나타났고 이것을 -10°C 이상에서의 전해질 용출량과 비교했을 때 유의성 있는 차이를 보였으므로 저온 치사 온도는 -10°C 와 -15°C 사이에서 나타날 것으로 예측되었고, 열치사법을 이용했을 경우 -20°C 에서 50% 이상의 전해질 용출이 나타났고 저온 치사 온도는 -10°C 와 -20°C 사이에서 나타날 것으로 예측되었다. 재생검사 결과에서 -10°C 온도 처리에서 50% 이상의 식물체가 생존하지 못하였음을 고려할 때(Table 1 and Fig. 2), 냉각치사법 및 열치사법 모두에서 -10°C 와 -15°C 사이의 치사 온도를 예측할 수 있는 잎을 표본조직으로 사용하였을 경우 더욱 신뢰성 있는 저온 치사 온도를 예측할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 최대 전해질 용출량을 구하기 위한 온도 처리 방법에 있어서는 냉각치사법이 잎과 신초 정단 모두에서 열치사법과 비교하여 상대적으로 높은 전해질 용출량을 보였고 -10°C 와 -15°C 사이에서 저온 치사 온도가 나타날 것으로 예측되어 재생 검사의 결과와 일관성을 보였다. 이러한 결과는 열치사법에 비해 냉각치사법에서 세포막 손상이 상대적으로 적기 때문에 식물 침출액의 최대 전기전도도(potential electrical conductivity)도 낮았고 그 결과 각 저온 처리 온도에 따른 전해질 용출량이 상대적으로 높게 나타난 것으로 보인다. 전해질 용출법이 재생 검사 결과보다 낮은 치사 온도를 예측하여 내한성을 과대평가하였다는 선행연구(Anderson et al., 1988; Cardona et al., 1997; Fry et al., 1993; Kim et al., 2010; Maier et al., 1994)의 결과들을 고려할 때, 냉각치사법은 비교적 높은 전해질 용출값을 나타내어 예측 저온 치사 온도를 상승시키는 경향이 있으므로 내

Table 2. Effects of low temperature treatments on electrolyte leakage of *Pittosporum tobira* samples collected from leaf and shoot apex.

Treatment temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Leaf electrolyte leakage (%)		Shoot apex electrolyte leakage (%)	
	Freeze-killing method ^z	Heat-killing method ^y	Freeze-killing method	Heat-killing method
0	8.20 \pm 1.18 b ^x	10.68 \pm 2.82 c	17.13 \pm 1.53 c	18.05 \pm 2.34 d
-5	11.14 \pm 2.02 b	12.84 \pm 1.53 c	18.01 \pm 1.00 c	28.08 \pm 2.82 cd
-10	20.49 \pm 2.25 b	25.51 \pm 10.46 b	37.61 \pm 8.14 b	37.04 \pm 3.40 c
-15	76.47 \pm 6.45 a	68.72 \pm 3.06 a	60.90 \pm 4.33 a	49.71 \pm 3.89 b
-20	74.06 \pm 4.98 a	65.33 \pm 2.13 a	66.34 \pm 3.32 a	65.80 \pm 2.29 a
-25	90.65 \pm 15.14 a	74.45 \pm 4.49 a	69.15 \pm 5.32 a	76.03 \pm 5.90 a

^zElectrolyte leakage was expressed as a percentage of solution electrical conductivity after temperature treatment compared to potential electrical conductivity after freeze-killing at -50°C ~ -55°C .

^yElectrolyte leakage was expressed as a percentage of solution electrical conductivity after temperature treatment compared to potential electrical conductivity after heat-killing at 80°C .

^xValues are means \pm SE of five replications (0°C , -5°C , -10°C , and -25°C) or ten replications (-15°C and -20°C). Means followed by different letters within columns are significantly different at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

한성의 과대평가를 보완하기 위해 적용되어야 할 방법으로 분석되었다.

전해질 용출법에 의한 저온 치사 온도 예측

돈나무의 전해질 용출량과 처리 온도와의 관계를 비선형 회귀를 통하여 분석한 결과 도출된 함수는 선행 연구들의 결과(Anderson et al., 1988; Cardona et al., 1997; Kim, 2006; Kim et al., 2010; Maier et al., 1994; McKellar et al., 1992)와 유사하게 S자 반응 곡선의 형태가 나타났다(Figs. 3 and

4). 비선형회귀식을 통하여 계산된 반응 곡선의 변곡점에 해당하는 온도(T_m)는 최대 전해질 용출량의 50% 이상이 용출되기 시작하는 온도로서 내한성 측정에 가장 결정적인 지점 이므로 예측 치사 온도로 평가되고, 식물의 내한성 평가에 유용한 척도로 활용된다(Anderson et al., 1988; Cardona et al., 1997; Kim, 2006; Kim et al., 2010; Maier et al., 1994; McKellar et al., 1992). 돈나무의 잎을 표본 조직으로 사용하였을 때 예측된 치사 온도는 냉각치사법에서 $-12.17 \pm 2.31^\circ\text{C}$, 열치사법에서 $-11.07 \pm 2.74^\circ\text{C}$ 였으며, 변곡점에서의 기울기

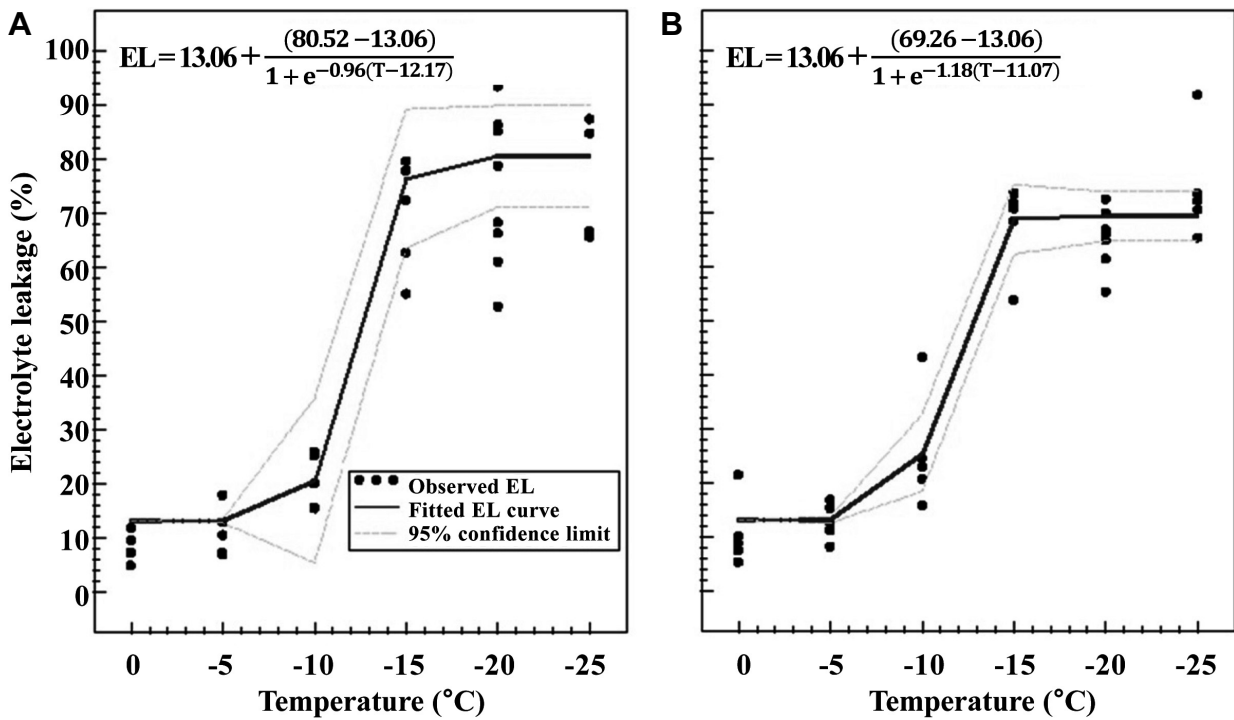


Fig. 3. Scattered plot and fitted electrolyte leakage (EL) curve for leaves of *Pittosporum tobira* following exposure to treatment temperatures. EL was calculated using potential electrical conductivity measured by freeze-killing method (A) and heat-killing method (B).

Table 3. Predicted lethal temperature for leaf and shoot apex of *Pittosporum tobira* analyzed by non-linear regression and linear interpolation.

Sampled plant tissue	Electrolyte leakage calculation method	Lethal temperature ($^\circ\text{C}$)	
		Non-linear regression	Linear interpolation
Leaf	Freeze-killing method	-12.17 ± 2.31^z	-12.82 ± 0.13^y
	Heat-killing method	-11.07 ± 2.74	-12.79 ± 0.17
Shoot apex	Freeze-killing method	-12.58 ± 2.56	-13.98 ± 0.96
	Heat-killing method	-16.37 ± 3.00	-16.88 ± 1.24

^zValues were estimated parameters at the inflection point of electrolyte leakage response curves at $\pm 95\%$ confidence intervals calculated by nonlinear regression procedure.

^yValues are means \pm SE of 25 replications.

는 냉각치사법에서 0.96, 열치사법에서 1.18로서 명확한 S자 반응 곡선의 형태를 보였다(Table 3 and Fig. 3). 신초 정단을 표본 조직으로 사용하였을 때 예측된 치사 온도와 변곡점에서의 기울기는 냉각치사법에서 각각 $-12.58 \pm 2.56^{\circ}\text{C}$ 와 0.66, 열치사법에서 각각 $-16.37 \pm 3.00^{\circ}\text{C}$ 와 0.32였고, 잎 표본 조직에서의 결과와 비교하여 상대적으로 낮은 값을 나타내었다(Table 3 and Fig. 4). 따라서 신초 정단을 표본 조직으로 사용한 경우는 상대적으로 내한성이 강하게 평가되었고 이러한 경향은 열치사법에서 더욱 현저하게 나타났다. 재생 검사에서 돈나무의 저온 치사 온도가 $-10^{\circ}\text{C} \sim -5^{\circ}\text{C}$ 로 분석된 결과를 고려할 때(Table 1 and Fig. 2), 신초 정단과 열치사법을 적용한 조합을 제외한 나머지 경우는 재생검사와 동일한 또는 유사한 저온 치사 온도가 예측되었다(Table 3). 이 중 신초 정단과 냉각치사법을 적용한 조합은 재생검사와 유사한 저온 치사 온도를 나타내었지만 반응 곡선 변곡점의 기울기는 잎 표본 조직을 사용한 경우 보다 낮았다. 전해질 용출 반응 곡선의 기울기는 저온 스트레스에 대한 저항성을 나타내는 중요한 척도로서 Cardona et al.(1997)은 저온 순화된 식물의 전해질 용출 반응 곡선의 기울기가 순화되지 않은 식물에 비하여 완만하였다고 보고하였으며,

Gudleifsson et al.(1986)은 저온처리에 대한 식물의 생존율의 관계 함수에서 반응 곡선의 기울기가 완만할수록 저온 저항성이 강한 경향이 있다고 하였다. 신초 정단을 사용했을 경우 동일한 저온처리 조건에서 잎을 사용했을 때보다 반응 곡선의 기울기가 상대적으로 완만하게 나타났으므로 내한성이 다소 과대평가되었다고 볼 수 있다(Fig. 4). 전해질 용출법 적용 시 내한성의 과대평가 경향은 선행 연구들에서 오차 발생 요소로서 보고된 바 있으므로(Anderson et al., 1988; Cardona et al., 1997; Iles and Agnew, 1995; Kim et al., 2010) 이러한 내한성 과대평가의 경향을 최소화하기 위해서는 반응 곡선의 기울기가 상대적으로 완만한 신초 정단을 사용하기보다 잎을 표본조직으로 사용하고 모든 잎과 신초 정단 모두에서 과대평가 경향이 나타나지 않았던 냉각치사법을 적용하는 것이 평가 모델의 신뢰성을 높일 수 있을 것으로 분석되었다.

저온 치사 온도 예측을 위한 통계 모델 평가

선형보간법을 통하여 예측된 저온 치사 온도는 비선형회귀로 예측된 저온 치사온도(T_m)보다 전반적으로 낮게 나타났다(Table 3). 선형보간법을 통해 예측된 저온 치사온도는

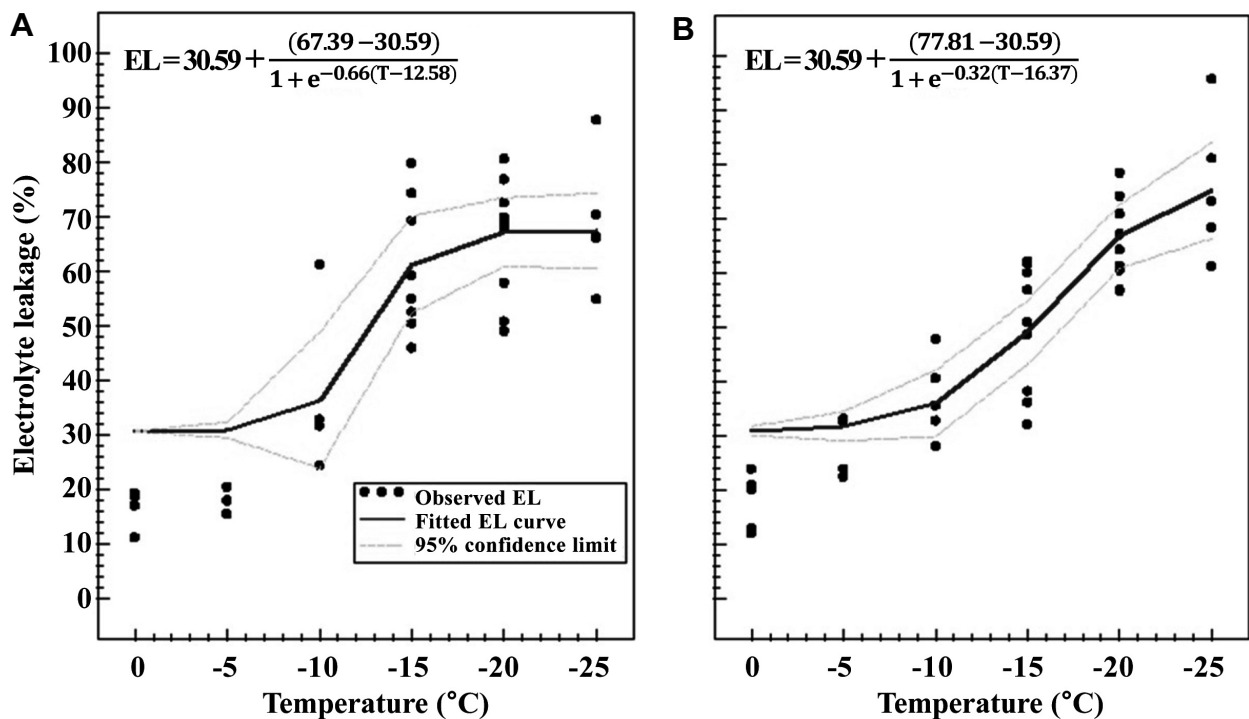


Fig. 4. Scattered plot and fitted electrolyte leakage (EL) curve for shoot apex of *Pittosporum tobira* following exposure to treatment temperatures. EL was calculated using potential electrical conductivity measured by freeze-killing method (A) and heat-killing method (B).

잎을 표본 조직으로 사용하였을 때 냉각치사법에서 $-12.82 \pm 0.13^{\circ}\text{C}$, 열치사법에서 $-12.79 \pm 0.17^{\circ}\text{C}$ 였으며, 신초 정단을 표본 조직으로 사용하였을 때 예측된 치사 온도는 냉각치사법에서 $-13.98 \pm 0.96^{\circ}\text{C}$, 열치사법에서 $-16.88 \pm 1.24^{\circ}\text{C}$ 로 재생 검사에서 나타난 저온 치사 온도인 $-10^{\circ}\text{C} \sim -5^{\circ}\text{C}$ 보다(Table 1) 낮아 내한성을 과대평가하는 경향을 보였다. 신초 정단에서 예측된 저온 치사 온도는 잎에서의 저온 치사 온도보다 낮았으므로 신초 정단을 표본 조직으로 사용했을 경우 내한성 과대평가의 정도가 높았고 열치사법에서 더욱 현저하게 나타났다. 이와 같이 잎 및 신초 정단, 냉각치사법 및 열치사법의 각 조합에 따라 선형보간법으로 예측된 저온 치사 온도는 비선형회귀의 결과와 유사한 패턴을 보였으나 전반적으로 저온 치사 온도가 낮게 예측되어 내한성의 과대평가 정도가 비선형회귀의 결과에 비하여 상대적으로 높았다. 결과적으로 선형보간법은 비선형회귀와 비교하여 유사한 저온 치사 온도를 예측한다고 볼 수 있지만, 전해질 용출법을 이용한 평가 연구들(Anderson et al., 1988; Cardona et al., 1997; Fry et al., 1993; Kim et al., 2010; Maier et al., 1994)에서 보고되었던 내한성의 과대평가로 인한 오차를 최소화하고 평가 모델의 신뢰도를 높이기 위해서는 내한성의 과대평가 경향이 상대적으로 낮은 비선형회귀를 통한 통계적 예측 모델의 적용이 적합할 것으로 판단되었다.

는 평가 모델 개발을 위하여 재생 검사 결과에 근거한 전해질 용출법의 방법적 구성을 비교 분석한 결과를 종합해 보면 처리 온도 별 전해질 용출분석에서는 잎을 표본조직으로 사용하였을 경우 냉각치사법 및 열치사법 모두에서 신초 정단을 사용한 경우보다 재생 검사에 근접한 결과를 보였고(Table 2), 냉각치사법은 잎과 신초 정단 모두에서 열치사법보다 신뢰성 있는 저온 치사 온도 예측이 가능한 것으로 나타났다(Figs. 3 and 4). 치사 온도 예측을 위한 통계적 모델 평가에서는 비선형회귀와 선형보간법 모두에서 내한성이 다소 과대평가되는 경향을 나타냈고, 선형보간법을 통하여 예측된 저온 치사 온도는 비선형회귀를 통한 결과보다 다소 낮아 내한성 과대평가의 정도가 상대적으로 강한 경향을 보였다. 또한 신초 정단을 표본 조직으로 사용한 경우 저온 치사 예측 온도가 상대적으로 낮아 내한성 과대평가의 정도가 강했으며 특히 열치사법에서 강하게 나타났다(Table 3). 결과적으로 전해질 용출 측정을 위한 표본 조직은 신초 정단보다 잎을 사용하고 최대 전해질 용출 측정을 위한 온도 처리는 열처리법보다 냉각치사법을 적용하며 저온 치사 온도를 예측하는 통계적 기법은 선형보간법보다 비선형회귀를 적용할 경우 가장 적합한 실험 방법 모델을 구성하는 것으로 분석되었다(Fig. 5).

초 록

내한성 평가 모델링

본 나무의 내한성을 편리하고 신뢰성 있게 예측할 수 있

본 연구는 남부 지방에서 널리 사용되고 있는 상록활엽수

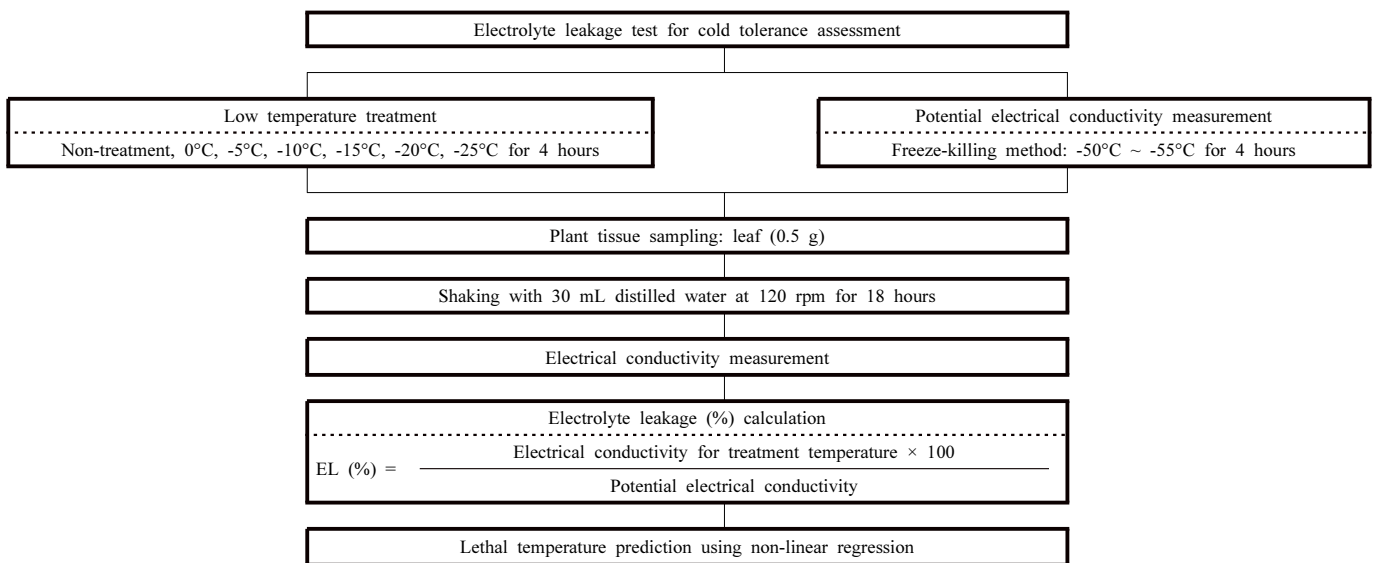


Fig. 5. Assessment model optimized to increase confidence in predicting cold tolerance of *Pittosporum tobira*.

인 돈나무의 내한성 예측을 위한 편리하고 신뢰성 있는 평가 모델 개발을 목적으로 전해질 용출법을 통한 내한성 평가에서 나타나는 실험방법 상의 오차를 최소화하는 내한성 평가 모델을 도출하고자 수행되었다. 평가 모델링은 저온 처리된 식물체에 대한 재생검사와 전해질 용출 평가로 구성되었고, 전해질 용출법에서 표본조직 선택, 최대 전해질 용출 측정을 위한 온도 처리법, 치사 온도 예측을 위한 통계 분석법에 의한 방법적 조합들로부터 예측된 치사 온도들이 재생검사 결과와 비교되었다. 재생 검사 결과 돈나무의 저온 치사 온도는 50% 미만의 생존율을 보이는 최고온도인 $-10^{\circ}\text{C} \sim -5^{\circ}\text{C}$ 로 분석되었고, 이 결과를 바탕으로 전해질 용출법에 의해 예측된 저온 치사 온도를 분석한 결과, 잎을 표본 조직으로 하여 냉각치사법으로 최대 전해질 용출을 측정하는 방법적 조합에서 재생 검사 결과와 가장 근접한 예측 저온 치사 온도가 나타났다. 저온 치사 온도 예측을 위한 통계 모델 평가에서는 선형보간법이 비선형회귀에 비하여 내한성을 과대평가하는 경향이 상대적으로 높았다. 결론적으로 돈나무 내한성 예측을 위한 내한성 평가 모델은 잎을 표본 조직으로 사용하고, 최대 전해질 용출 측정을 위한 온도 처리 방법으로 냉각치사법을 적용하며, 치사 온도 예측을 위한 통계 분석 기법으로 비선형회귀를 활용하는 방법적 구성이 가장 적합한 것으로 나타났다.

추가 주요어 : 상록활엽수, 전해질 용출법, 치사 온도, 선형보간법, 비선형회귀, 재생 검사

인용문헌

- Anderson, J.A., M.P. Kenna, and C.M. Taliaferro. 1988. Cold hardiness of 'Midiron' and 'Tifgreen' bermudagrass. *HortScience* 23:748-750.
- Anderson, J.A., C.M. Taliaferro, and D.L. Martin. 1993. Evaluating freeze tolerance of bermudagrass in a controlled environment. *HortScience* 28:955.
- Bannister, P. 2007. Godley review: A touch of frost? Cold hardiness of plants in the southern hemisphere. *N.Z. J. Bot.* 45:1-33.
- Cardona, C.A., R.R. Duncan, and O. Lindstrom. 1997. Low temperature tolerance assessment in *Paspalum*. *Crop Sci.* 37:1283-1291.
- Chun, J.U., S.W. Kang, D.S. Song, and J. Choi. 2000. Establishment of simple method for freezing resistance with use of electrical conductivity and 2, 3, 5-tripenyl tetrazolium chloride in tea (*Camellia sinensis* L.). *J. Kor. Tea Soc.* 6(3):121-133.
- Dunn, J.H., S.S. Bughrara, M.R. Warmund, and B.F. Fresenbug. 1999. Low temperature tolerance of zoysiagrasses. *HortScience* 34:96-99.
- Fry, J.D., N.S. Lang, R.G.P. Clifton, and F.P. Maier. 1993. Freezing tolerance and carbohydrate content of low temperature-acclimated and non-acclimated centipedegrass. *Crop Sci.* 33:1051-1055.
- Gudleifsson, B.E., C.J. Andrews, and H. Bjornsson. 1986. Cold hardiness and ice tolerance of pasture grasses grown and tested in controlled environment. *Can. J. Plant Sci.* 66:601-608.
- Iles, J.K. and N.H. Agnew. 1995. Seasonal cold-acclimation patterns of *Sedum spectabile* × *telephium* L. 'Autumn Joy' and *Sedum spectabile* Boreau. 'Brilliant'. *HortScience* 30:1221-1224.
- Ingram, D.L. 1985. Modeling high temperature and exposure time interaction on *Pittosporum tobira* root cell membrane thermostability. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:470-473.
- Ingram, D.L. and D.W. Buchanan. 1981. Measurement of direct heat injury of roots of three woody plants. *HortScience* 16:769-771.
- Ingram, D.L. and D.W. Buchanan. 1984. Lethal high temperatures for roots of three citrus rootstocks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109:189-193.
- Kim, I.H. 2006. Development of shallow-extensive green roof system for urban greening. PhD Thesis, Gyeongsang National Univ., Jinju, Korea.
- Kim, I.H., K.Y. Huh, and M.R. Huh. 2003. Heat tolerance assessment of *Sedum* species used for green roof systems. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 21(Suppl. II):125.
- Kim, I.H., K.Y. Huh, and M.R. Huh. 2010. Cold tolerance assessment of *Sedum* species for shallow-extensive green roof system. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:22-30.
- Lee, S.H., I.H. Heo, K.M. Lee, and W.T. Kwon. 2005. Classification of local climatic region in Korea. *Asia-Pac. J. Atmos. Sci.* 41:983-995.
- Maier, F.P., N.S. Lang, and J.D. Fry. 1994. Evaluation of an electrolyte leakage technique to predict St. Augustinegrass freezing tolerance. *HortScience* 29:316-318.
- Manley, R.C. and R.L. Hummel. 1996. Index of injury compared to tissue ionic conductance for calculating freeze damage of cabbage tissues. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:1141-1146.
- Martineau, J.R., J.E. Specht, J.H. Williams, and C.Y. Sullivan. 1979. Temperature tolerance in soybeans. I. Evaluation of a technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Sci.* 19:75-78.
- McKellar, M.A., D.W. Buchanan, D.L. Ingram, and C.W. Campbell. 1992. Freezing tolerance of avocado leaves. *HortScience* 27:341-343.

- Park, S.G. and K.K. Oh. 2002. Conservation status and restoration of evergreen broad-leaved forests in warm temperate region, Korea (I). Kor. J. Environ. Ecol. 16:309-320.
- Shashikumar, K. and J.L. Nus. 1993. Cultivar and winter cover effects on bermudagrass cold acclimation and crown moisture content. Crop Sci. 33:813-817.
- Shim, K.K., K.J. Lee, S.T. Choi, M.B. Choi, S.R. Shim, Y.S. Kim, S.B. Choi, H.S. Jin, Y.H. Cho, Y.B. Kim, J.C. Nam, and W.K. Shim. 1993. Landscape dendrology. 5th ed. Munundang, Seoul, Korea.
- Shin, C.S. 2011. Cold tolerance assessment of *Lagerstroemia indica* and *Pyracantha angustifolia* with dormant branches. J. Kor. Inst. Landscape Archit. 39(6):118-125.
- Shin, H.C., N.C. Park, and J.H. Hwang. 2006. Warm-temperate tree species of South Korea. Forest Research Institute, Seoul, Korea.
- Shin, H.C., N.C. Park, I.H. Kim, and K.Y. Huh. 2009. Cold tolerance assessment of *Quercus* spp. as evergreens for the central region in South Korea. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 27(Suppl. II):158-159.
- Steponkus, P.L. and F.O. Lanphear. 1967. Refinement of triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. Plant Physiol. 42:1423-1426.