식물학회지 제34권 제1호
Korean J. Bot. 34(1) : 25~30

포플라 잎절편의 중늑에서 부정아 형성에 미치는 양이온의 영향

金 秀 珍·金 明 苑*·康 榮 熹
(延世大學校 理科大學 生物學科, *文理大學 生物學科)

Effects of Cations on Adventitious Bud Formation on the Midvein of Leaf Segment in Poplar

Kim, Soo Jin, Myeong Won Kim* and Young Hee Kang
(Department of Biology, Yonsei University, Seoul and
**Department of Biology, Yonsei University, Wonju)*

ABSTRACT

This study was designed to investigate the relationships of cations to the polar regeneration of adventitious buds on midvein segments of poplar leaves.

Basal regeneration was disturbed by adding Ca^{2+}. When higher concentration of exogeneous Ca^{2+} was added to the WPM (Woody Plant Medium), the more adventitious buds were formed on midvein segments, and polar regeneration was inhibited. Added Ca^{2+} from 0 to 9.70 mM with 0.5 mM of EGTA to WPM decreased the calcium effect. The treatment of La^{3+} with 7.05 mM of Ca^{2+} ovecame the effect of Ca^{2+}. The cations Mg^{2+} and K^{+} also caused regeneration on both basal and distal site. However, polar regeneration was maintained in the medium containing Ca^{2+} without Mg^{2+}. The above result suggests that exogenous Ca^{2+} or cations inhibit polar regeneration of poplar.

서 론

대부분의 식물에서 발생, 생장시 극성을 나타내는데, 특히 조직절편에서 유관속분화는 뚜렷하게 극성을 나타내며, 잎의 절편배양시 중늑의 기부 절단면에서 분화된다(Paterson, 1983). 특히 포플라의 잎의 중늑 배양에서는 기부에서 부정아가 형성되고 중늑을 micro-cross section하여 배양할 경우에는 부정아는 중늑의 기부에서 형성되는 등(Lee-Stadelmann *et al.*, 1989) 절편의 크기, 형태에 상관없이 극성을 나타내었다. 이러한 부정아의 극성분화는 잎절편 유관속의 기부 절단면에서의 유조직 세포분열에 의하여 형성되고 이것은 오옥신의 극성이동에 의해 오옥신이 기부에 축적되는 사실과 일치하므로 극성분화가 오옥신과 밀접한 관계가 있다고 생각되어지며(Paterson, 1983), 오옥신의 억제제인 TIBA나 NPA에 의해 오옥신 극성이동이 억제될 뿐만 아니라 극성분화도 억제되는 것은 오옥신과 극성분화가 연관되어 있음을 확실하게 해준다(Smulders *et al.*, 1988; Van Artrijk and Blom-Baroorn, 1984). 한편 오옥신 이외에도 양이온들에 의하여 생장과 분화가 영향을 받는다고 알려져 있는데, 분화가 일어나는 동안 세포막으로 유입되는 양이온이 극성분화에 중요한 역할을 한다(Fulton, 1980; Goodwin *et al.*, 1983; Jaffe, 1981; Weisenseel and Jaffe, 1976).

*Pelvitia*의 접합자의 생장이나 *Lilium* 화분관 형성 또는 *Acetabularia*의 분화 등에서 양이온의 세포분화 조절에 관하여 알려졌는데, *Pelvitia* 접합자는 Ca^{2+} 농도구배가 형성되었을 때, Ca^{2+} 농도가 높은 극에서 생장하였다(Robinson and Jaffe, 1975). 즉 외부에서 Ca^{2+}을 3배로 높혀주면 전체적인 세포내 electrical current도 두배 내지 세배 증가하였고, 생장도 증가되었다. 생장하는 *Lilium longiflorum*

Thunb.의 화분관에서 K^+의 농도를 3배로 높혀주면 $^{45}Ca^{2+}$의 세포내 유입이 약 20% 증가되었고, 화분관 생장도 증가되었다. 즉 K^+ 농도를 증가시키면 화분관 정단부위로의 Ca^{2+} 유입이 영향을 받아 화분관 신장에 영향을 미친다(Jaffe, 1977). 또한 *Acetabularia*에서 Ca^{2+}과 Mg^{2+}의 농도가 높을수록 cap 형성율이 높아지고(Goodwin *et al.*, 1983), Ca^{2+}, Mg^{2+} ionophore를 처리하여 *Acetabularia*의 이온분포 균형을 잃으면 분화가 억제되며, 이는 세포막 사이의 이온의 흐름에 양이온이 중요한 역할을 하여 분화가 영향을 미치기 때문이다(Goodwin and Pateromichelakis, 1979). 이와 같이 분화가 일어나는 동안 세포막의 이온 유입에 따른 electrical current는 식물의 분화에 영향을 미치는데, electrical current가 조직내 생장조절물질의 세포에서 세포로의 이동에도 영향을 주어 생장을 자극하기도 하는데, 생장의 촉진은 조직에서 세포간의 세포구성성분을 이동시킴으로써 일어난다는 가능성도 제시되고 있다(Gill *et al.*, 1987).

포플라에서 극성분화는 식물의 호르몬, 조직의 종류, 크기, 형태 또는 계절적 요인 등 여러 요인에 대해 연구되어 왔으나(Lee-Stadelmann *et al.*, 1989) 아직 극성분화 기작에 대한 연구는 밝혀지지 않았다.

본 실험에서는 지금까지 살펴본 바와 같이 생장조절물질인 오옥신과 양이온이 극성분화와 밀접한 관계가 있으며, 이온분포의 차가 기관 분화에 영향을 미친다는 사실을 기초로 Ca^{2+}을 중심으로 몇 가지 양이온을 처리하여 포플라의 극성분화가 어떠한 영향을 받는지 알아보고 조직절편에서의 극성분화와 양이온과의 상호관계를 이해함으로써 식물조직 절편에서의 극성분화를 규명하는데 일환이 되고자 한다.

재료 및 방법

실험재료. 포플라(*Populus nigra* var. *betufolia*×*Populus trichocarpa*)를 27℃±3℃인 온실에서 16시간 빛을 주면서 재배하여 재료로 사용하였다. 실험재료로는 포플라 가지의 위에서 세번째 잎으로 길이 3 cm 정도되는 것을 사용하였으며, 잎을 0.8% sodium hypochlorite 용액에 3분간 소독한 뒤 멸균 증류수로 세번 씻어 사용하였다. 멸균한 잎을 중늑을 중심으로 0.5 cm 길이로 잘라 중늑 절편을 취하였고, 이 때 엽육조직은 될 수 있는대로 잘라버린 후 사용하였으며, Woody Plant Medium(WPM; Lloyd and McCown, 1980)에서 배양하였다. WPM에는 양이온인 Ca^{2+}의 공급원으로 $Ca(NO_3)_2$, Mg^{2+}의 공급원으로는 $MgSO_4$ 그리고 K^+의 공급원으로는 KNO_3가 사용되었다. 호르몬으로는 BA와 NAA를 각각 0.2 ppm, 0.1 ppm으로 사용하였고, 배지의 pH는 5.6으로 조정하였다.

Ca^{2+}이 부정아 형성에 미치는 영향. 극성분화에 미치는 Ca^{2+}의 효과를 알아보기 위하여 Goodwin 등(1983)의 방법을 수정하여 WPM 배지의 Ca^{2+} 농도를 0배(0 mM), 1배(2.35 mM), 2배(4.70 mM), 3배(7.05 mM), 4배(9.40 mM)씩 각각 첨가하여 중늑 절편을 배양하였다. 이 때 Ca^{2+} 농도조절은 $Ca(NO_3)_2$을 사용하였으며, $CaCl_2$는 대조구와 실험구 모두 동일 농도를 사용하였다. 배양한지 2주가 지난 후 형성된 부정아의 수를 proximal, middle, distal로 구분하여 해부현미경으로 관찰하였고, 이 때 표준 WPM에서 배양한 중늑 절편을 대조구로 하였다.

EGTA와 $LaCl_3$ 처리에 의한 효과. Ca^{2+}이 극성분화에 미치는 영향을 간접적으로 알아보기 위하여 Saunders and Helpler 등(1983)의 방법을 수정하여 사용하였다. Ca^{2+} chelating agent인 EGTA 0.5 mM을 Ca^{2+} 농도를 위와 같은 방법으로 첨가한 배지에 각각 처리하여 부정아의 수를 조사하였다. 또한 표준 WPM에 Ca^{2+}의 농도를 3배(7.05 mM)로 증가시킨 다음, $LaCl_3$ 농도를 0, 20, 40, 60, 80 μM씩 각각 첨가한 배지에서 배양하여 2주 후에 부정아의 수를 각각 부위별로 조사하였다.

^{14}C-NAA의 흡수 및 분포. Ca^{2+}과 auxin과의 상호관계를 알아보기 위하여 ^{14}C-NAA를 사용하였다. WPM내의 Ca^{2+} 농도를 증가시키면서 ^{14}C-NAA 0.005 mg/*l*(0.04 μCi)과 unlabeled NAA 0.005 mg/*l*을 0.2 mg/*l* BA가 포함된 배지에 함께 넣었다. 이러한 배양액에서 조직절편을 48시간 배양한 뒤 세개씩 각 부위별로 scintillation fluid(PPO, 5.5 g; POPOP, 0.1 g; toluene, 667 m*l*; triton X-100, 333 m*l*)에 분류하여 넣고, 일정시간이 경과한 후 Liquid Scintillation spectrometer(Packard, Tricarb 330)로 그 방사능의 양을 측정하였다.

$^{45}Ca^{2+}$의 흡수 분포. WPM에 Ca^{2+}의 농도를 증가시킬 때 $^{45}CaCl_2$의 양(0.65 μCi) 함께 증가시키면서 시료를 배양하면서, ^{14}C-NAA의 경우와 같은 방법으로 흡수된 방사능의 양을 측정하였다.

다른 양이온이 극성분화에 미치는 영향. 극성분화에 미치는 K^+의 효과를 알아보기 위하여 WPM에 KNO_3를 0, 2.35, 4.70, 7.05, 9.40 mM씩 각각 첨가하였다. Mg^{2+}의 효과를 조사하기 위하여 Ca^{2+}이나 K^+효과 실험과 같은 방법으로 Mg^{2+}의 농도를 변화시켜 조사하였다. 또한 $MgSO_4$를 제외한 WPM에 Ca^{2+}을 증가시킨 후 2주간 배양하여 형성된 부정아의 수를 조사하였다.

결과 및 고찰

포플라는 잎의 절편 배양시 중늑의 기부 절단면에서만 부정아가 형성되는 극성분화의 양상이 뚜렷하다. 이러한 극성분화의 생리적 근본원인은 알려지지 않았으나, 잎절

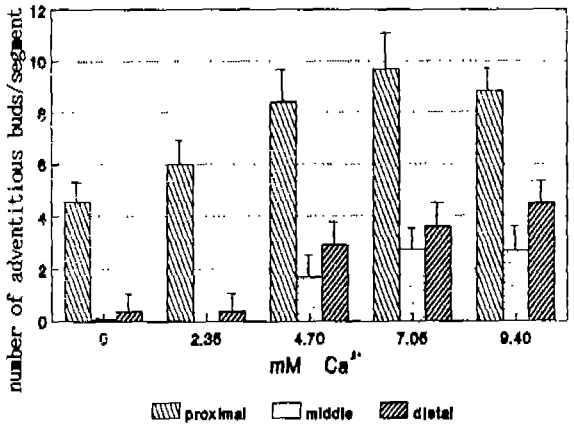

Fig. 1. Effect of Ca^{2+} on adventitious bud formation in midvein segmenmts of poplar cultured in WPM for 2 weeks.

Table 1. ^{14}C-NAA uptake of midvein segment of poplar cultured in WPM for 48 h

Ca^{2+} [mM]	Midvein (cpm/segment)			Total
	Proximal	Middle	Distal	
0	24964± 1095 (53)	10654± 948 (22)	11865± 988 (25)	47483± 2663
2.35	26886± 1441 (57)	9886± 1323 (21)	10349± 853 (22)	47121± 1753
4.70	23969± 1663 (56)	9847± 899 (21)	9819± 858 (23)	43635± 2112
7.05	22381± 1760 (58)	9118± 687 (19)	9726± 1012 (23)	41225± 2490
9.40	25632± 914 (62)	8887± 1027 (17)	9047± 1492 (22)	43566± 1948

(% of total)

Table 2. $^{45}Ca^{2+}$ uptake of midvein segment of poplar cultured in WPM for 48 h

Ca^{2+} [mM]	Midvein (cpm/segment)			Total
	Proximal	Middle	Distal	
0	510± 44 (32)	534± 23 (33)	564± 39 (35)	1608± 85
2.35	725± 35 (32)	740± 62 (33)	766± 39 (35)	2241± 91
4.70	975± 48 (32)	1040± 59 (34)	988± 47 (33)	3003± 104
7.05	1469± 391 (30)	1943± 120 (40)	1447± 359 (30)	4859± 408
9.40	1753± 269 (30)	2076± 220 (36)	1950± 211 (34)	5779± 221

(% of total)

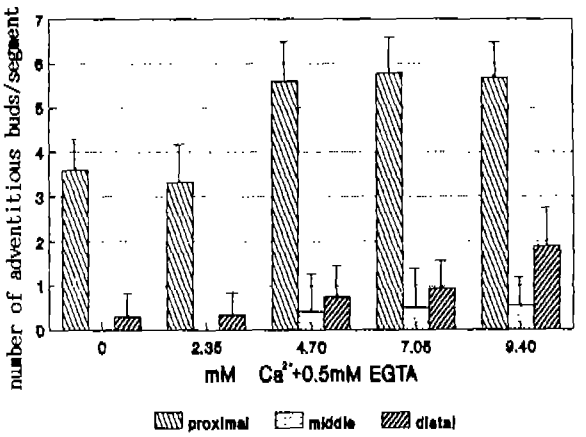

Fig. 2. Effect of Ca^{2+} and EGTA on adventitious bud formation in mivein segment of poplar cultured in WPM for 2 weeks.

편의 분화가 일어나는 부위가 오옥신이 축적되는 기부와 일치하며(Paterson, 1983), 오옥신 억제제인 TIBA나 NPA에 의해 오옥신 극성이동이 억제될 뿐만 아니라 극성분화도 억제하는 것은 생장조절물질인 오옥신이 극성분화와 연관되어 있음을 나타낸다(Smulders *et al.*, 1988; Van Artrijk and Blom-Barnoorn, 1984). 또한 오옥신 이외에도 분화가 일어나는 동안 세포막으로 유입되는 양이온에 의해 극성분화가 영향을 받는다고 알려져 왔다(Jaffe, 1981; Weisenseel and Jaffe, 1976).

극성분화 현상이 뚜렷한 포플라 잎의 중늑절편을 표준 WPM에서 배양하면 기부에서만 부정아가 형성되는 뚜렷한 극성분화를 보이는데, Ca^{2+} 농도가 증가됨에 따라 기부뿐만 아니라 중늑조직 절편상의 세맥으로 분지된 부위의 유조직에서도 부정아가 분화되어 극성분화윤은 감소되었으며, 설편의 전체 부정아 수는 증가되었다(Fig. 1). 이는 배지의 Ca^{2-} 농도가 증가됨에 따라 각 세포내로의 Ca^{2+} 유입이 증가되어 기부이외의 부위에도 부정아 형성이 증가된 것으로 생각되며, Ca^{2-}을 첨가하지 않은 배지에서도 부정아가 형성된 것(Fig. 1)과 외부 Ca^{2+}의 농도가 증가해도 ^{14}C-NAA의 축적과 이동에 영향을 미치지못하는 것(Table 1) 그리고 $^{45}Ca^{2+}$을 사용하였을 때 외부에서 처리한 Ca^{2+}의 잎절편내 흡수가 부위별로 비교적 균등한 것(Table 2)으로 보아 외부에서 처리한 Ca^{2+}은 오옥신 분포에 영향을 미치지 않는 것으로 보여지며, 기관분화 혹은 식물의 생장발달에 second messenger 역할을 하는 것으로 알려진 Ca^{2-}은 식물체내에 저장된 Ca^{2+}이 할 가능성을 시사한다.

반면 EGTA를 처리한 경우 Ca^{2-} 증가에 따른 극성분

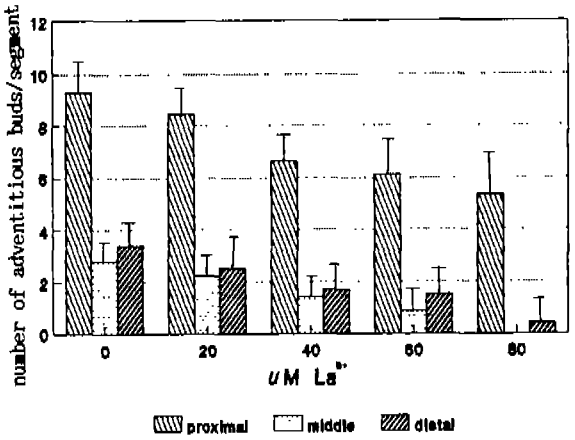

Fig. 3. Effect of La^{3+} on adventitious bud formation in midvein segment cultured in 7.05 mM Ca^{2+} for 2 weeks.

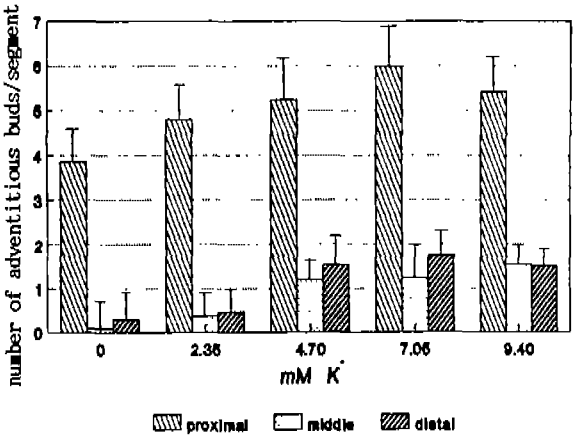

Fig. 5. Effect of K^{+} on adventitious bud formation in midvein segments of poplar cultured in WPM for 2 weeks.

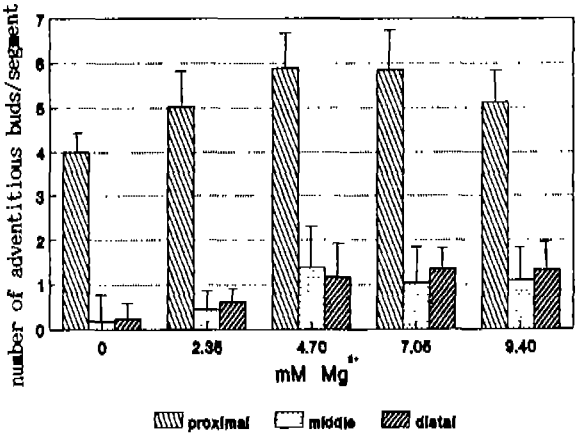

Fig. 4. Effect of Mg^{2+} on adventitious bud formation in midvein segments of poplar cultured in WPM for 2 weeks.

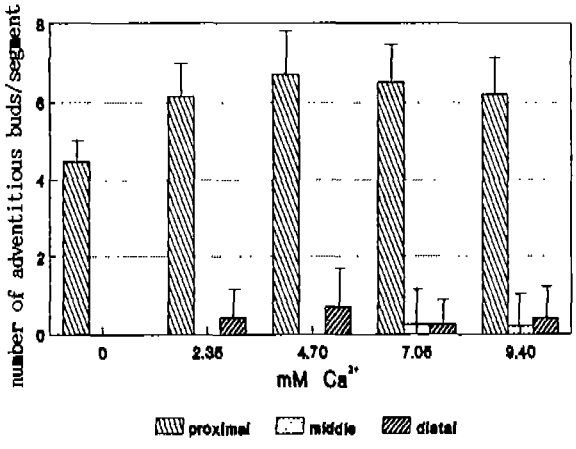

Fig. 6. Effect of Ca^{2+} on adventitious bud formation in midvein segments of poplar cultured in WPM without Mg^{2+} for 2 weeks.

화율의 감소가 다소 둔화되어 Ca^{2+}만 처리된 경우보다 전체 부정아수는 감소하였으나, 기부에서의 부정아형성율은 10-20% 더 높았는데(Fig. 2), EGTA는 배지의 Ca^{2+} 흡수를 억제함으로써 외부에서 처리한 Ca^{2+}에 의한 극성분화 감소율을 회복시키지만 Ca^{2+}의 농도가 높아짐에 따라 기부 외의 부위에서도 부정아 형성이 증가하여 이와 같은 회복 현상이 없어진다. 또한 대조구에 비해 전체 부정아 수에 대한 기부에서의 부정아 형성율이 60% 감소하여 극성분화 현상이 가장 억제되었던 7.05 mM Ca^{2+}을 처리한 배지에(Fig. 1) Ca^{2+}과 경쟁적으로 작용하여 Ca^{2+}의 세포내 이동을 억제하는 La^{3+}(Saunderand Hepler, 1983)을 농도구배하면, La^{3+} 80 μM 농도에서 전체 부정아수에 대한 기부에서의 부정아 형성율은 92%가 되어 대조구에서의 극성분화율과 같아지는데(Fig. 3) La^{3+}은 Ca^{2+}이 세포내로 이동하는 것을 억제하므로 Ca^{2+}을 증가시켰을 때의 효과가 감소된다. 이러한 결과들은 외부에서 처리한 Ca^{2+}이 잎의 중늑절편의 기부 뿐만 아니라 그 외의 부위에서도 분화를 촉진하여 부정아 수를 증가시킴으로써 극성분화율은 감소시킨다는 사실을 뒷받침한다.

또한 K^{+}이나 Mg^{2+}을 처리한 경우 Ca^{2+}에서와 유사하게 농도가 증가함에 따라 잎절편 전체의 부정아수는 증가하였으나 극성분화율은 감소하였으며(Figs. 4, 5), 각 이온농도가 9.40 mM일 때를 비교하면 기부에서 부정아 형성율의 감소는 Ca^{2+}이 36%, K^{+}과 Mg^{2+}이 25%로 Ca^{2+}을 처리한 경우가 가장 많이 감소하였으며, 기부 이외의 부위의 증가율도 Ca^{2+}이 다른 양이온의 경우보다 높게 나

타났다. 반면 WPM에서 Mg^{2+}을 제외하고, Ca^{2+}을 증가시켜 배양한 경우 기부에서의 극성분화율은 거의 90%를 유지하여 극성분화율이 감소되지 않았으며, 조직절편의 전체 부정아수는 대조구보다 0-12% 증가하여 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 6). 이런 현상은 결과에는 나타내지 않았으나, 배지내에 Ca^{2+}을 제외하고 K^+의 농도를 높여주었을 때도 유사했다. 각 양이온들이 부정아 형성에 미치는 효과는 Ca^{2+}에 의하여 가장 큰 영향을 받는데, 식물세포에서 세포질내 Ca^{2+}의 농도변화는 여러 가지 이온수송에도 영향을 미친다(Hedrich, 1989; Hedrich and Neher, 1987). 이러한 사실은 본 실험에서의 9.40 mM의 각 양이온 효과에서 Ca^{2+}에 의하여 극성분화율이 가장 크게 감소하고 절편상의 부정아수는 증가한 것과 일치한다(Figs. 1, 5, 6). 세포막에서 각 이온의 유입을 조절하는 channel은 서로 다른 양이온의 농도에 의해서도 조절되어 진다. *Eremosphaera viridis*에서 K^+ channel은 외부 Ca^{2+}의 농도에 의해서 일시적으로 활성화되며(Kohler *et al.*, 1986), 성장하는 화분관의 외부 K^+ 농도를 3배로 증가시키면 $^{45}Ca^{2+}$ 유입이 증가하며 화분관이 신장한다(Jaffe, 1977)는 보고에서 볼 수 있는 바와 같이 분화가 일어나는 동안 K^+, H^+, Ca^{2+} 등이 상호 연관되어 분화에 영향을 미치는 것으로 생각되며, *Acetabularia*에서 Ca^{2+}과 Mg^{2+}의 농도가 높을수록 분화율이 높아지고, Ca^{2+}, Mg^{2+} ionophore를 처리하여 이온 분포 균형을 잃으면 분화가 억제되는데(Goodwin, 1983), 이는 세포막 사이의 이온의 흐름에 양이온이 관여하여 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Goodwin and Pateromichelakis, 1979). 이는 본 실험에서 배지내의 한 가지 양이온을 제외하고 다른 양이온을 증가시켜 포플라 잎절편을 배양했을 경우 관찰된 극성분화율 유지가 이를 뒷받침한다. 그러므로 대조구에서 나타나던 극성분화율이 양이온 처리에 의하여 감소되는 것은 세포막 내외의 이온 분포차에 의하여 분화가 일어나지 않던 부위에서 분화를 일으킨다고 생각된다. 그러나 과연 외부에서 처리한 Ca^{2+}이 포플라의 중늑 절편에서 극성분화율을 낮추고, 부정아 형성율을 높이는데 어떻게 생리적으로 작용하는지에 대해서는 앞으로 더 연구해 보아야 될 과제라 사료된다.

적 요

포플라의 잎을 기본배지인 WPM에 BA 0.2 ppm, NAA 0.01 ppm을 첨가하여 배양하면 극성분화가 일어나서 대부분의 조직에서 기부 절단면에 부정아가 형성되는데, 본 연구는 Ca^{2+}과 몇 가지 양이온이 포플라의 극성분화에 미치는 영향을 조사하였다. WPM내에 Ca^{2+}의 농도를 높여주면 잎절편에서 분화된 전체부정아의 수는 증가하지만 극성분화는 억제되었고, EGTA를 처리하면 Ca^{2+}에 의한 극성분화의 억제가 다소 둔화되었다. 한편 Ca^{2+}의 농도를 높여주면서, ^{14}C-NAA의 흡수 및 분포를 관찰하면 auxin의 차등분포는 크게 영향을 받지 않았다. Ca^{2+}에 의한 극성분화의 억제현상은 Ca^{2+} 뿐만 아니라 배지내에 첨가되는 다른 양이온인 Mg^{2+}과 K^+의 농도를 높여준 경우에도 나타났다. 따라서 포플라의 극성분화에 미치는 양이온의 영향은 지금까지 극성분화의 조절요인이라 알려진 auxin과 상호작용하기보다는 세포막 내외의 이온분포차에 의한다고 생각된다.

참 고 문 헌

Fulton, A.B. 1980. Calcium ions, electrical currents and the choreography of (some) eucaryotic cells. *Cell* **22**: 5-6.

Gill, R., K.P. Mishra and P.S. Rao. 1987. Stimulation of shoot regeneration of *Vigna aconitifolia* by electrical control. *Ann. Bot.* **60**: 399-403.

Goodwin, B.C., J.L. Skelton, and S.M. Kirk-Bell. 1983. Control of regeneration and morphogenesis by divalent cation in *Acetabularia mediterranes. Planta* **157**: 1-7.

Goodwin, B.C. and S. Pateromichelakis. 1979. The role of eloectrical field, ions, and cortex in the morphogenesis of *Acetabularia. Planta* **145**: 427-435.

Hedrich, R. 1989. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **40**: 539-569.

Hedrich, R. and E. Neher. 1987. Cytoplasmic calcium regulates voltage dependent ion channels in plant vaculoes. *Nature* **329**: 833-836.

Jaffe, L.F. 1977. Electrical controls of development. *Ann. Rev. Biophys.* **6**: 447-475.

Jaffe, L.F. 1981. The role of ion currents in establishing developmental gradients. *In*, International Cell Biology. H.G. Schweiger (ed.). Springer-Verlag, Berlin. 507 pp.

Kohler, K., W. Steigner, W. Simonis, and W. Urbach. 1986. Potassium channels in *Eromosphacra viridis. Planta* **166**: 490-499.

Lee-Stadelmann, O.Y., S.Y. Lee, W.P. Hackett and P.E. Read. 1989. The formation of adventitious buds in vitro on micro-cross sections of hybrid *Populus* leaf midveins. *Plant Sci.* **61**: 263-272.

Lloyd, G. and B. McCown. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia,* by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Propagators Soc.* **30**: 421-427.

Paterson, K.E. 1983. Polarity of regeneration in excised leaves of *Crassula argenteal.* I. A role of auxin. *Can. J. Bot.* **61**: 1058-1063.

Robinson, K.R. and L.F. Jaffe. 1975. Polarizing *Fucoid* eggs drive a calcium current through themselves. *Science* **187**: 70-72.

Saunders, M.J. and P.K. Hepler. 1983. Calcium antagonist and calmodulin inhibitors block cytokinin-induced bud formation in *Funaria*. *Exp. Biol.* **99**: 41-49.

Smulders, M.J., A.F. Croes and G.J. Wullems. 1988. Polar transport of 1-naphthalene acetic acid determines the distribution of flower buds on explants of tobacco. *Plant Physiol.* **88**: 752-756.

Van Aartrijk, J. and G.J. Blom-Barnoorn. 1984. Adventitious bud formation from bulb-scale explants of *Lilium speciosum* Thumb. in vitro. Interracting effects of NAA, TIBA, wounding and temperature. *J. Plant Physiol.* **116**: 409-416.

Weisenseel, M.H. and L.F. Jaffe. 1976. The major growth current through Lily pollen tube enter K^+ and leaves as H^+. *Planta* **129**: 1-7.

(1990. 11. 2 接受)