

용설란(*Agave deserti* Engelm)에 있어서 氣孔開閉와 孔邊細胞內 K^+ 와 Na^+ 濃度變化와의 關係

吳 熙 穆 · 張 楠 基

서울대학교 생물교육과

The Relationship between Stomatal Behavior and K^+ , Na^+ Fluctuations of Guard Cells in CAM Plant, *Agave deserti* E.

Oh, Hee-Mok and Nam-Kee Chang

Dept. of Biology Education, Seoul National University

ABSTRACT

The K^+ and Na^+ contents in the guard cells of *Agave* which had a characteristic of CAM plant were measured by using "Rolling technique". That results were correspond with the change of the stomatal aperture width. That is to say, stomatal movement of *Agave* is due to the change of K^+ and Na^+ concentration in the guard cells. As *Agave* which was used in this experiment showed two peaks of which one was at 3 hour and the other was at 24 hour in stomatal aperture width, it was seemed that *Agave* had both characteristics of CAM and C_3 pattern.

Key words: Guard cell, Stomatal aperture, *Agave*.

緒 論

植物의 氣孔(stoma)은 孔邊細胞(guard cell)가 물을 흡수하여 열리게 된다. 물을 흡수하게 되는 것은 孔邊細胞內의 용질농도를 높여 滲透電荷(osmotic potential)를 낮춤으로 해서 가능한 것이다. 역사적으로 볼 때 孔邊細胞內의 용질농도가 높아지게 되는 現狀을 說明하는 여러 學說이 있다. 1856년 Von Mohl은 孔邊細胞內의 葉綠體가 빛을 받았을 때, 생성된 光合成 산물이 滲透壓을 높이고, 결국 氣孔을 열게 한다고 說明했다(Heath, 1975).

그후 1920년경 Steward는 葉肉細胞(mesophyll cell)에서 光合成作用이 일어나면 細胞內의 CO_2 농도가 감소하고, 따라서 pH의 증가를 가져오며, 이것은 澱粉을 糖으로 變化시키는 phosphorylase의 活性도를 크게 하여, 결국 생성된 糖이 용질농도를 높이는 주된 역할을 하게 된다고 說明하였다(Meidner and Mansfield, 1968). 그러나, 1905년 Macallum에 의해 孔邊細胞內에 K^+ 가 蓄積되는 現狀이 관찰되고(Salisbury and Ross, 1978), 1968년 Fisher and Hsiao

는 孔邊細胞內的 K^+ 濃度 變化가 氣孔開閉에 影響을 미치는 주된 要因임을 실험적으로 입증했다. 그 후 이런 現狀은 여러 식물에서 관찰되어 1973年 Willmer는 50여 種의 식물의 列을 報告하였고, 1975年 Kaufmann은 이들 現狀이 밤에 氣孔이 열리는 몇몇 CAM 식물에도 적용된다고 주장하였다(Raschke, 1975).

CAM식물의 特性을 나타내는 용설란에 있어서 기공저항과 잎의 溫度와의 관계(Nobel, 1976), 용설란이 밤에 氣孔을 연다는 事實이 관찰(Nobel, 1976)되고, 氣孔開閉에 미치는 빛, CO_2 , 蒸氣壓, 溫度 등의 환경요인(Nebel and Hartssock, 1979)에 대한 研究가 있었으나, 아직 氣孔開閉과 孔邊細胞內的 이온濃度와의 직접적인 관계에 대한 研究는 이루어지지 않고 있는 실정이다.

그러므로 本 實驗은 용설란을 材料로 하여 形態관찰, 잎의 氣孔 크기 및 수 測定, 孔邊細胞內的 이온濃度와의 관계를 비교 分析하여 용설란의 氣孔開閉에 미치는 K^+ 와 Na^+ 의 效果를 보았다.

材料 및 方法

1. 材 料

本 實驗에 使用한 용설란(*Agave deserti* E.)은 다년생의 多肉質 식물로 實驗 2주전부터 growth chamber에서 길렀다. 이때 낮의 최고 온도는 $30 \pm 1^\circ C$ 이고, 밤의 최저온도는 $10 \pm 1^\circ C$ 이며, 9時에서 19時 30分까지는 수은등을 使用하여 照度を 6900Lux로 조절하였다(Nobel and Hartssock, 1978).

2. 잎과 氣孔의 形態 및 수 測定

잎의 크기는 여러 個體의 용설란에서 無作爲의으로 잎을 選擇하여 길이 및 폭을 測定했고, 氣孔의 形態와 수는 時間別로 Latex 또는 Manicure를 잎의 表面에 발라 鑄型(mould)을 만든 후 떼어내어 micrometer가 부착된 현미경으로 100배 시야에서 단위면적(mm^2)당 氣孔의 수를 測定했고, 400배 시야에서 無作爲의으로 8~12개의 氣孔을 選擇하여 길이 및 폭을 測定하였다.

3. Rolling technique

잎의 表皮細胞中에서 드물게 분포하는 孔邊細胞內的 이온의 濃度を 測定하기 위해서는 다른 表皮細胞를 파괴시키고, 孔邊細胞만을 完全한 狀態로 보존하는 方法이 必要하다. 本 實驗에서는 孔邊細胞와 表皮細胞의 彈力性의 차이를 이용한 rolling technique에 의해 孔邊細胞만을 選擇的으로 完全하게 유지했다(Fisher, 1968; Allaway and Hsiao, 1972). 하루 24時間 中 1시간 30분 간격으로 잎을 직경 8mm의 cork borer로 뚫어 sample을 취한 후, abaxial 表皮를 벗겨 0.1mM $CaCl_2$ 용액에 2분간 담구었다(Rogers *et al.*, 1979). 그 후 表皮조각(strips)을 유리판 위에 놓고, 1.5mm 두께의 彈力性 있는 고무를 입힌 유리대롱으로 適切한 壓力을 주어 굴리면, 다른 表皮細胞는 파괴되고, 孔邊細胞만이 完全한 狀態로 남게 된다. 이것을 다시 0.1mM $CaCl_2$ 용액에 넣고 파괴된 細胞에서 溶출된 K^+ , Na^+ 등의 이온이 씻겨 나가게 했다. 씻는 時間은 總 20分을 넘지 않게 하고 4번 씻는다.

4. 表皮細胞의 염색

- ① 염색액은 27.5g의 sodium cobaltinitrite를 38ml 증류수에 녹이고, 여기에 5.0ml의 glacial acetic acid를 가하여 잘 저어주면서 증류수를 첨가하여 총 55ml가 되게 한다.
- ② 固定液은 glycerol과 ammonium sulphide를 同量으로 섞어 만든다.
- ③ Rolling technique에 의해 選擇的으로 파괴된 表皮(strips)는 실온에서 1분간 염색액에 담근 후, 총 5분간 0℃의 증류수에서 4번 씻고 난 다음 固定液에서 발색시키면, K⁺농축 정도에 따라서 검은 침전물이 생긴다. 이것을 관찰하고 현미경 사진을 촬영한다.

5. K⁺와 Na⁺ 濃度測定

Rolling technique에 따라 選擇的으로 파괴된 3개의 표피 조각(strips)을 2ml의 증류수가 들어 있는 10ml의 beaker에 옮긴다. 100℃에서 건조시킨 후, 약 100℃에서 5% HNO₃ 용액으로 1시간동안 끓인 다음 피펫으로 추출액을 빼내고, 5% HNO₃ 용액을 소량 가하여 추출액이 총 38ml가 되게 한다. Flame photometry를 사용하여 이 용액의 K⁺와 Na⁺를 定量한다.

위의 實驗方法은 Fig. 1에 도표로 나타나 있다.

結 果

1. 氣孔의 구조와 수

本 實驗에 使用한 용설란의 잎의 크기, 기공의 크기와 수 등 形態의인 特徵을 調査한 結果는 Table 1에서 보는 바와 같다.

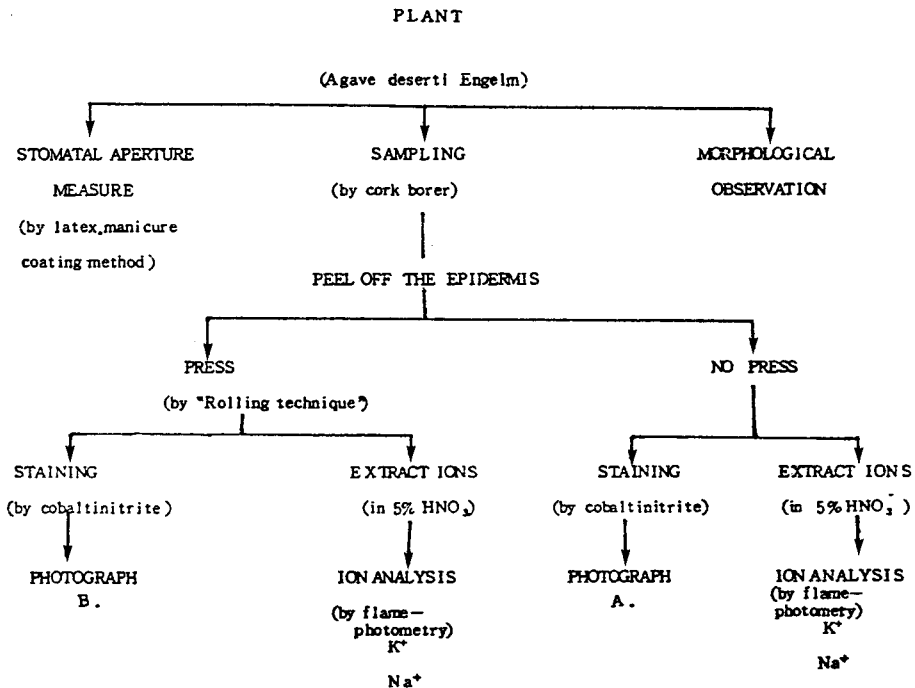


Fig. 1. Diagram of the experimental methods.

Table 1. Characteristics of the leaf

Leaves			
Number /plant	11 ±2	(7)	
Length	31.6±2.1cm	(15)	
Width	4.8±0.9cm		
Stomatal pore			
length	25 ±4 μm	(20)	
width	7 ±0.5μm	(20)	
Stomatal frequency			
adaxial surface	28 ±1 /mm ²	(12)	
abaxial surface	23 ±1 /mm ²	(12)	

Data are presented as average±SD. (no. of samples)

식물 個體당 잎의 수는 사막지방에서 자라는 용설란의 경우 29 ± 4 (Nobel, 1976)인데 비해 본 實驗에서는 11 ± 2 로 현저하게 작았으며, 氣孔의 出現 頻度에 있어서도 adaxial의 경우 사막에서는 32 ± 2 인데 비해 28 ± 1 로 약 13%의 감소를 보이고, abaxial의 경우 사막에서는 30 ± 3 인데 비해 23 ± 1 로 약 23%의 감소를 보인다. Adaxial이 abaxial보다 1.2배 정도 기공수가 많은 것은 사막이나 온대지방에서 자란 용설란 모두에 一致하는 結果이다.

2. Rolling technique에 의한 表皮細胞의 選擇的 破壞

表皮細胞中에서 孔邊細胞만을 選擇的으로 完全하게 保存하는 rolling technique을 써서 表皮 조각(strips)을 染色하여 현미경 사진을 촬영한 結果는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

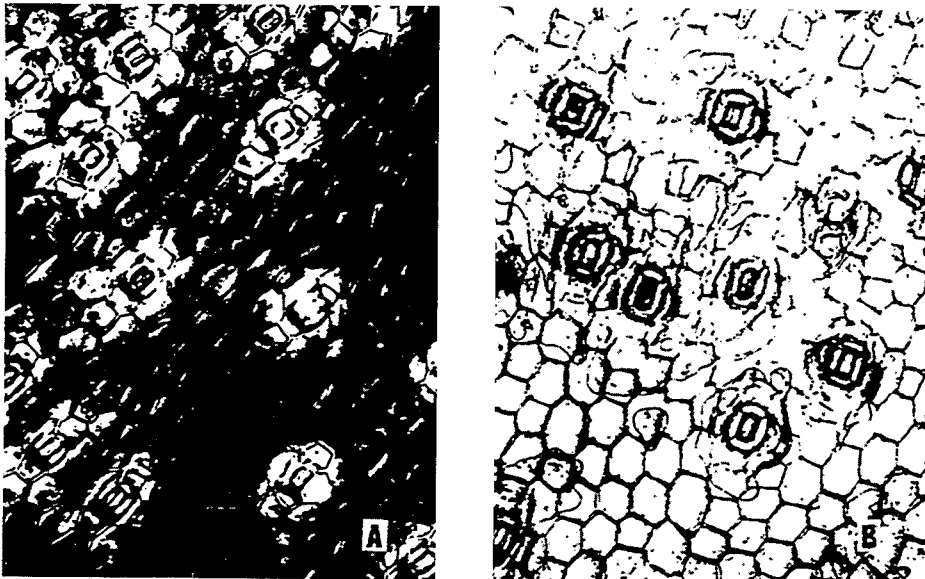


Fig. 2. Sodium cobaltinitrite staining method used in judging vitality of guard cells in epidermal strips.

A. before rolling the strip(no press). ×100. exposure time 1 /10sec.

B. after rolling the strip(press). ×100. exposure time 1 /10sec.

Fig. 2의 A는 rolling technique를 사용하지 않은 것, 즉 表皮細胞에 壓力을 주지 않고 染色한 것으로서 전체적으로 K⁺가 고르게 分布하고 있으므로 검게 染色된 것을 볼 수 있다. Fig. 2의 B는 rolling technique를 사용한 것, 즉 表皮細胞에 適切한 壓力을 가한 것으로 孔邊細胞를 除外한 나머지 表皮는 破壞되어 細胞內의 K⁺가 溶출되었기 때문에 sodium cobaltinitrite에 의해 染色되지 않았음을 알 수 있다.

이 結果는 *Vicia faba*로 實驗한 Allaway와 Hsiao(1972)의 結果에 一致하는 것이다.

3. 氣孔開口(Stomatal aperture)의 日變化

Growth chamber내의 하루 중 溫度變化和 조도는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 18時경에 31℃로 最高溫度를 나타내었고, 最低溫度는 6時경으로 9℃였다. 하루 중 溫度 變化는 40℃로 상당히 큰 變化를 보였다. 照度는 9시부터 19시 30분까지 6,900 Lux였으며, 그외에는 0 Lux로 나타났다.

이러한 조건에서 용설란의 氣孔開口의 日變化 정도를 조사한 結果가 Fig. 4와 같다. 24시경에 3.2μm로 최대의 氣孔開口(stomatal aperture)를 보였다. 이것은 12시나 17시경에 비하면 약 6.2배의 증가를 보인 것이다. 이 結果는 *Opuntia basilaris*와 *Kalanchoe daigremontiana* 등이 24시경에 기공이 최대로 열린다는 實驗結果(Kluge and Ting, 1978)와 一致한다.

15時경에 1.4μm 정도의 一時的인 開孔을 나타냈다.

4. 孔邊細胞內의 K⁺와 Na⁺ 濃度 變化

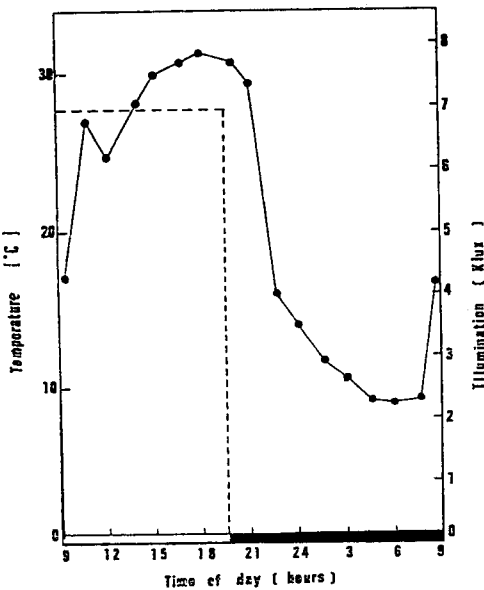


Fig. 3. Temperature and illumination changes in growth chamber during a day. (Temperature:real line, Illumination :dot line)

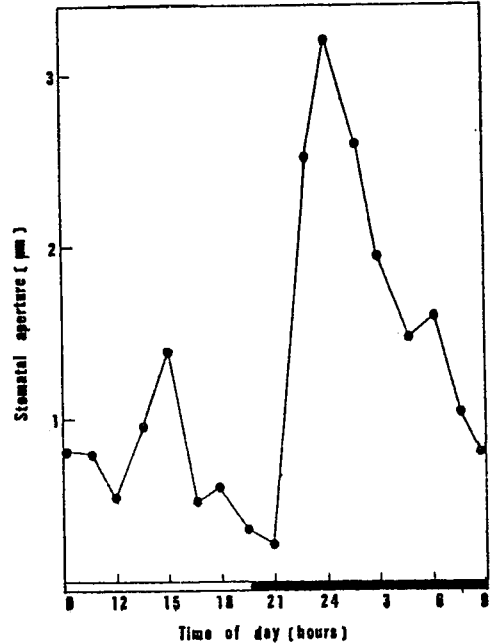


Fig. 4. The change of stomatal aperture during a day. Data are presented as average.

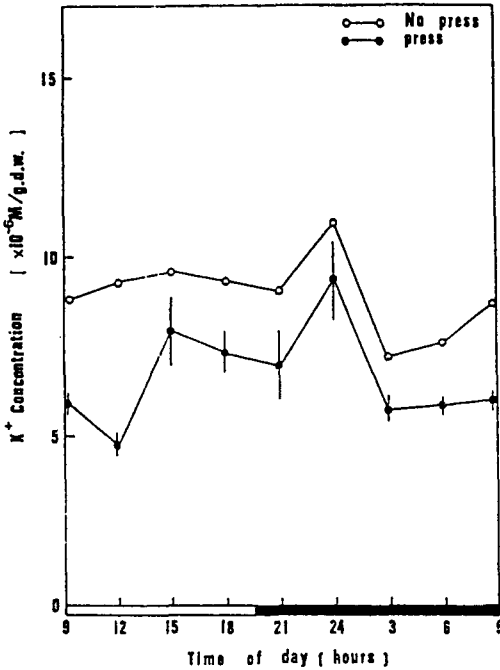


Fig. 5. K⁺ concentration in guard cells and epidermal cells.
(No press:K⁺ in epidermal cells, press:K⁺ in guard cells)

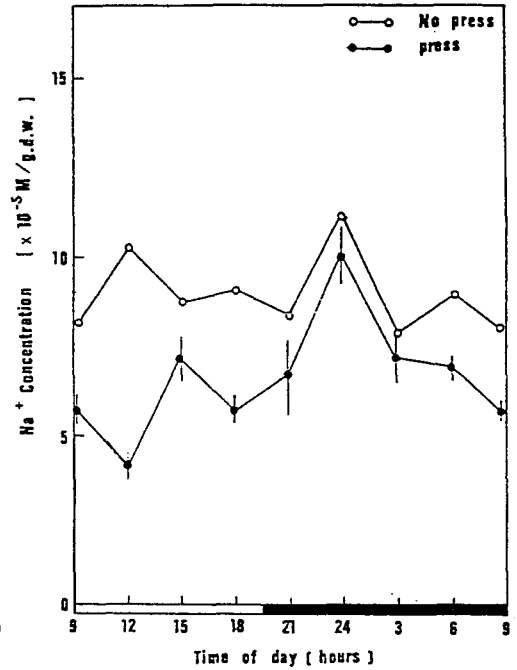


Fig. 6. Na⁺ concentration in guard cells and epidermal cells.
(No press:Na⁺ in epidermal cells, press:Na⁺ in guard cells)

2회 반복 試行한 實驗 結果는 Fig. 5(K⁺)와 Fig. 6(Na⁺)과 같다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 表皮細胞에 적절한(by rolling technique) 壓力을 주었을 때, 즉 孔邊細胞內的 K⁺ 濃度는 24時경에 9.4μM/g.d.w.로 최대였으며, 15時경에도 8.0μM/g.d.w. 정도로 비교적 큰 값을 보였다. 전체적으로 濃度變化는 4.8~9.4μM/g.d.w.였다. 表皮細胞에 壓力을 주지 않았을 때, 즉 表皮細胞全體의 K⁺ 濃度는 9시부터 21시까지 9.3±0.3μM/g.d.w.로 큰 증가를 보이고 그후 다시 감소하였다.

Fig. 6에는 Na⁺ 濃度變化가 나타나 있다. 表皮細胞에 適切な 壓力을 주었을 때, 즉 孔邊細胞內的 Na⁺ 濃度는 24時경에 1μM/g.d.w.로 최대였으며, 15時경에도 7.0×10⁻⁵M/g.d.w.로 약간의 증가를 보였다. 전체적인 농도 변화는 4.2~10.0×10⁻⁵M/g.d.w.였다. 또한 表皮細胞 전체의 Na⁺농도는 24時경에 약 1.1×10⁻⁵M/g.d.w.로 크게 나타났으며 전체적으로 壓力을 주었을 때보다 큰 값을 나타냄을 確認할 수 있다.

이 結果에 의하면 孔邊細胞內的 K⁺와 Na⁺농도가 24時경에 최대를 나타내며 15時경에도 약간의 증가 現象을 보인다. 이것은 솔잎 國화에서 K⁺와 Na⁺가 모두 氣孔開閉에 影響을 준다고 報告한 Bloom(1979)의 結果에 一致하는 것이다.

論 議

사막지방에서 自生하는 용설란의 경우 야간에 氣孔을 열어 CAM 식물의 特性을 보이지만 (Nobel, 1976), 수분조건이 좋아지면 낮에 氣孔을 열고 C_3 形의 光合成 pattern을 보이는(Nobel and Hartsock, 1979) 2중적인 特徵이 있는 식물로 報告되었다. 本 研究에서 使用한 용설란은 수분조건이 양호한 온실에서 재배해 온 것으로 實驗 2주전부터 온도 및 조도를 Fig. 3에서처럼 조절하였을 때 Fig. 4에서 보듯이 24時경과 15時경에 큰 開孔을 보인 것은, CAM과 C_3 形의 이중적인 特徵을 지닌 것으로 思料된다. 또한 사막식물은 좋지 못한 환경 조건에 適應하기 위하여 두터운 葉肉組織을 갖고, 밤에 기공을 열며 특이한 metabolism을 갖고 生活하나, 이것이 결코 C_3 形의 대사효율을 따르지 못한다는 報告(Bonner and Varner, 1976)를 고려할 때, 용설란이 양호한 환경조건에서 C_3 形의 대사작용을 보이리라 생각된다. 이것을 뒷받침하기 위해서는 기공의 開閉 以外에도 여러가지 다른 생리작용의 特性이 밝혀져야 하리라 생각된다.

본 연구에서 하루 중의 溫度變化와 氣孔開口變化의 關係를 보면 24시경에 최대의 개구를 보인 때는 $14^{\circ}C$ 였다.

이 결과는 Neales가 발표한 바와 같이(Devlin, 1975) CAM식물은 $15^{\circ}C$ 정도의 저온에서 수분증발이 적고, 기공을 통한 CO_2 의 흡입이 많으며, CO_2 고정기 최대로 일어난다는 결과에 상응하는 것이다. 15시경에 또 한 차례의 비교적 큰 氣孔開口를 보인 것은 C_3 形의 식물의 경우 어느 정도 溫度가 높아지며 기공은 좀더 열린다는 報告(Rogers *et al.*, 1976)를 생각할 때 본 實驗에 使用한 용설란이 낮에는 C_3 형 대사작용을 보이는 것으로 思料된다.

Fig. 2에서 보듯이 rolling technique를 적절히 使用하면 용설란의 表皮細胞 중에서 孔邊細胞만을 選別的으로 完全하게 保存할 수 있음을 알 수 있었다. 단지 材料에 따라 가해지는 壓力은 반복시행을 통하여 조절되어야 하리라 생각된다.

본 實驗의 결과 중에서 孔邊細胞內의 이온 濃도와 氣孔의 開口 정도를 보면 기공이 최대($3.2\mu m$)로 열리는 24시경에 K^+ 와 Na^+ 농도도 최대를 나타내 일치하는 결과를 보이며, 기공이 비교적 크게($1.4\mu m$) 열리는 15시경에도 K^+ , Na^+ 농도는 약간의 증가를 보여, 氣孔의 開閉에는 K^+ 와 Na^+ 등의 이온이 깊이 관여하고 있음을 알 수 있다. 이 結果는 孔邊細胞內에 전분을 갖지 않는 種인 *Allium cepa* L.로 實驗했을 때 K^+ 때로는 Na^+ 의 축적이 氣孔의 開閉에 直接的으로 關係가 있다는 研究(Schnabl and Raschke, 1980)와도 一致한다.

表皮細胞의 이온濃도의 變化를 보면 K^+ 의 경우는 낮에 거의 일정한 농도를 유지하다가 24시경에 약간의 증가를 보였다. 이것은 葉肉組織內의 K^+ 가 이동해 온 것으로 생각되며, Na^+ 의 경우에도 마찬가지이다. 이 결과는 솔잎국화(CAM plant)의 경우, 밤에는 공변세포내에 K^+ , Na^+ 등의 양이온이 축적되어 기공이 열리고(Willmer and Rutter, 1977; Bloom, 1979) vacuole 내의 malate가 저장되면 balancing cations로 表皮細胞가 孔邊細胞에 있는 K^+ 와 Na^+ 가 mesophyll cell로 점차로 이동하여 새벽녘에는 기공이 닫히게 된다는 報告를 생각할 때, 表皮細胞와 葉肉細胞間에는 이온의 日變化가 있는 것으로 思料된다. 그러나 孔邊細胞內에 쌓이는 K^+ , Na^+ 등의 이온이 表皮細胞에서 유래한 것인지 또는 葉肉細胞에서 이동한 것인지는 본 實驗結果로는 분명치 않다.

적 요

多肉質의 식물로서 두터운 表皮細胞를 갖는 용설란(*Agave deserti* E.)은 rolling technique에 의해 適切한 압력을 가한다면 表皮細胞 中에서 孔邊細胞만을 選擇적으로 完全하게 보존할 수 있음을 그림으로 確認하였다.

용설란의 氣孔開口는 24時경에 최대치를 나타내며, 15時경에도 약간의 증가 現狀이 있다. 孔邊細胞內의 이온 濃度는 24時경에 최대치를 나타내며, 15時경에도 약간의 증가 現狀이 있다. 따라서 위의 두 結果가 一致하는 것에 의하면, 孔邊細胞內의 K^+ 와 Na^+ 濃度가 氣孔開閉에 큰 影響을 미치는 것으로 思料된다.

溫度變化와 氣孔開口에서는 14℃에 氣孔이 최대로 열리고, 30℃에도 약간의 開孔을 보이지만, 다른 직접적인 관계는 볼 수 없었다. 즉 비교적 낮은 溫度에서 최대의 氣孔開口를 보이는데 이 溫度는 수분 증발을 막으면서 원활한 代謝作用을 이룰 수 있는 限界溫度로 생각된다.

이 結果로 용설란의 氣孔이 밤에 열리는 것은 CAM 식물의 特性을 지니고 있는 것이며, 낮 15時경에 약간의 開孔을 보이는 것은, 수분 조건이 양호하다면 C_3 形의 代謝作用을 보이는 것으로 思料된다. 즉 용설란은 環境條件에 따라 CAM과 C_3 形의 2중적인 特性을 가질 수 있음이 氣孔 관찰에 의하여 確認되었다.

인용문헌

- Allaway, W. G. and T. C. Hsiao. 1972. Preparation of rolled epidermis of *Vicia faba* L. so that stomata are only viable cells: analysis of guard cell potassium by flame photometry. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:309-318.
- Bloom, A. J. 1979. Salt requirement for Crassulacean Acid Metabolism in the annual succulent, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 63:749-753.
- Bloom, A. J. 1979. Diurnal ion fluctuations in the mesophyll tissue of the Crassulacean Acid Metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 64:919-923.
- Bonner, J. and J. E. Varner. 1976. *Plant biochemistry*. 3rd edition, Academic Press.
- Cockburn, W. 1978. Relationships between stomatal behavior and internal carbon dioxide concentration in Crassulacean Acid Metabolism plants. *Plant Physiol.* 63:1029-1032.
- Devlin, R. M. 1975. *Plant physiology*. 3rd edition, D. Van Nostrand.
- Fischer, R. A. 1968. Stomatal opening in isolated epidermal strips of *Vicia faba* : 1. Response to light and to CO_2 -free air. *Plant Physiol.* 43:1947-1952.
- Fischer, R. A. and T. C. Hsiao. 1968. Stomatal opening in isolated epidermal strips of *Vicia faba* : 2. Responses to KCl concentration and the role of potassium absorption. *Plant Physiol.* 43:1953-1958.
- Heath, O. V. S. 1975. *Stomata*. Oxford University Press
- Kluge, M. and I. P. Ting. 1978. *Crassulacean acid metabolism*. Springer-Verlag.
- Meidner, H. and T. A. Mansfield. 1968. *Physiology of stomata*. Mc Graw-Hill.

12. Nobel, P. S. 1976. Water relations and photosynthesis of a desert CAM Plant, *Agave deserti*. Plant Physiol. 58:576-582.
13. Nobel, P. S. and T. L. Hartsock. 1978. Resistance analysis of nocturnal carbon dioxide uptake by a Crassulacean Acid Metabolism succulent, *Agave deserti*. Plant Physiol. 61:510-514.
14. Nobel, P. S. and T. L. Hartsock. 1979. Environmental influences on open stomates of a Crassulacean Acid Metabolism plant, *Agave deserti*. Plant Physiol. 63:63-66.
15. Raschke, K. 1975. Stomatal action. Ann. Rev. Plant Physiol. 26:309-340.
16. Rogers, C. A., R. D. Powell and P. J. H. Sharpe. 1979. Relationship of temperature to stomatal aperture and potassium accumulation in guard cells of *Vicia faba*. Plant Physiol. 63:388-391.
17. Rogers, C. A., Sharpe, J. H. Peter, R. D. Powell and R. D. Spence. 1981. High-temperature disruption of guard cells of *Vicia faba*. Plant Physiol. 67:193-196.
18. Salisbury, F. B. and C. W. Ross. 1978. Plant Physiology. 2nd edition, Wadsworth Publishing Company.
19. Schnabl, H. and K. Raschke. 1980. Potassium chloride as stomatal osmoticum in *Allium cepa* L., a species devoid of starch in guard cells. Plant Physiol. 65:88-93.
20. Willmer, C. M. and J. C. Rutter. 1977. Guard cell malic metabolism gastomatal movements. Nature Vol. 269:327-328.

