

## Agar 배지를 이용한 건조 및 염 처리에 대한 벼 식물체의 근계 변화

강동진 · 石井龍一<sup>2</sup> · 김길웅<sup>1</sup> · 이인중<sup>1\*</sup>

경북대학교 농업과학기술연구소, <sup>1</sup>경북대학교 농업생명과학대학 농학과, <sup>2</sup>일본대학 생물자원과학부

Received January 28, 2004 / Accepted April 17, 2004

**Changes of Root System in Rice (*Oryza sativa* L.) Plant Under Salt- and Drought- Stressed Agar Medium Conditions.** Dong-Jin Kang, Ryuichi Ishii<sup>2</sup>, Kil-Ung Kim<sup>1</sup> and In-Jung Lee<sup>1\*</sup>. *Institute of Agricultural Science and Technology, and <sup>1</sup>College of Agriculture and Life- Sciences, Kyungpook National Univ., Daegu 702-701, Korea, <sup>2</sup>College of Bioresource Sciences, Nihon Univ, Fujisawa 252-8510, Japan* – This study was investigated the changes of root length, tissue structure of root tip, and dry matter production of a Dongjinbyeo (DJ) cultivar subjected to 0.4% agar medium with various concentration of NaCl (salt stress)- and polyethylene glycol 6000 (PEG, drought stress). Root length and dry weight of DJ plant were declined along the high concentration of PEG and NaCl in rice plants. To elucidate the changes of tissue structure in root tip to PEG- and NaCl-treatments, we examined the microscopic observation of root tip in NaCl- and PEG-treated rice plants using Toluidine blue O. By Toluidine blue O staining, methyl-lignin accumulation was found in the epidermis and outer cortex of the elongation zone at an early stage of PEG treatment, whereas was found only the outer cortex of the elongation zone of NaCl-treated root tip. The epidermis of NaCl-treated root tip became soften instead of methyl-lignin accumulation. TR ratio was increased along the high concentration in PEG- and NaCl-treated rice plant as a result of inhibited root elongation under PEG- and NaCl-treatment. From these morphological changes in root stimulated by drought and salt stress, we suggest that agar medium is useful to identify tolerant variety in germination stage under stressful environments.

**Key words** – Agar medium, drought stress, microscopic observation, *Oryza sativa* L., rice, salt stress.

식물체가 건조 및 염 스트레스를 받으면 각 기관의 물질 생산의 변이, 분화 및 발달 역제를 통해서 식물의 생산활동을 현저히 저하시켜, 식물의 생장, 형태, 개체발생 및 대사생리에 영향을 미치는 것으로 연구되어 왔다[7,8]. 염 및 건조 스트레스에 대한 연구는 수분결핍에 유도된 ABA 축적 등의 식물체내 호르몬의 변화[5,15], 광합성 조절[1,4], 삼투조절 물질인 proline의 축적과 체내 이동[13], 방사선 동위원소를 이용하여 비파괴적인 방법으로 식물체내 수분이동 등의 보고[10]가 있다. 또한 식물체가 염해를 입으면 줄기나 뿌리의 신장감소, 건물중의 감소, 염면적의 감소, 개화율의 지연이 된다고 알려져 있다[8].

현재까지 스트레스에 관련된 형태학적·생리학적 조사는 주로 포트 또는 양액재배로 이루어지고 있으며, 고체배지를 이용한 실험방법은 아직 확립되어 있지 않다. 이러한 점을 감안하여 본 실험은 고체 배지를 이용한 새로운 실험방법을 이용하여 건조 및 염 스트레스에 대한 식물체의 형태학적인 특성을 뿌리신장률, 근단구조, 물질생산 등의 측면에서 조사하여, 벼 발아단계에서 스트레스 내성품종 육성을 위한 새로운 선발방법을 제공하고자 본 실험을 수행하였다.

### 재료 및 방법

공시재료로서는 국내에서 널리 재배되고 있는 일반 재배형 동진벼(*Oryza sativa* L. var. Dongjinbyeo)를 사용하였다. 배지는 0.4% agar를 넣고 잘 녹인 다음, 배양시험관에 10 ml 씩 분주하여 agar 고체 배지(이후, 고체배지라 칭함)를 작성하였다. 종자는 1% 차아염소산 나트륨으로 10분간 종자표면을 살균한 후, 5번 정도 증류수로 행군 후[12], 표면 살균한 동진벼를 고체배지가 들어 있는 배양시험관에 1립씩 치상하였다. 처리구는 0.4% 한천을 넣고 pH 5로 교정한 대조구와 1%, 2%, 4% polyethylene glycol 6000 (PEG)을 넣은 건조 처리구, 10 mM, 50 mM, 100 mM NaCl을 넣은 염 처리구를 설정하였다. 식물체 생육은 각 처리구별 10반복으로 하였으며 주간 24시간 주기, 광도 2,400 Lux, 온도 24℃의 향온실에서 치상 후 5일간 생육하였다.

치상 후 5일간 생육시킨 식물체를 채취하여 뿌리길이를 측정하였으며, 지상부와 지하부로 나누어 80℃에서 72시간 이상 건조시킨 후, 건물 생산량을 조사하였다. 상대 건물중(%)의 산출식은 아래와 같이 구하였다.

$$\text{상대 건물중(\%)} = (\text{처리구 건물무게} \div \text{대조구 건물무게}) \times 100$$

뿌리조직의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해 4% PEG 처리구와 100 mM NaCl 처리구에서 생육시킨 벼 식물체 근단

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5708, Fax : +82-53-958-6880

E-mail : ijlee@knu.ac.kr

2 mm 정도까지의 부분을 채취하여 FAA 고정액(formalin: acetic acid: 50% ethanol = 0.5: 0.5: 9 v/v)으로 고정하였다. 조직 관찰용 절편은 채취한 근단을 4% agar 배지에 조심스럽게 넣고 포매한 후 절편용 블록을 작성하였다[6]. 조직 관찰은 면도날을 이용하여 100 µm 정도의 두께로 횡단으로 제작한 후, methyl-lignin 축적에 의한 리그닌화(목질화)된 조직을 진한 녹색으로 염색하는 것이 특징인 0.05% Toluidine Blue O로 염색한 다음, 증류수로 5번 정도 세척하였다[9]. 근단 구조는 200배율로 설정한 역상현미경(IMT2-21, Olympus Ltd.)으로 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

**건조 및 염 처리에 따른 뿌리신장**

건조 및 염 처리한 고체배지에서 치상 후 5일간 생육시킨 동진벼의 뿌리 길이를 조사하였다. PEG 처리농도에 따른 뿌리길이는 대조구(0% PEG)에 비해 1% PEG 처리구는 92%, 2% PEG 처리구는 67%, 4% PEG 처리구는 14%로 PEG 농도를 높임에 따라 신장의 억제가 관찰되었으며(Fig. 1, PEG). 특히 2%와 4% PEG 처리구에서는 현저하게 뿌리신장이 억제되었다. 한편, NaCl 처리에 따른 뿌리길이는 대조구(0 mM NaCl)에 비해 10 mM NaCl 처리구에서는 96%, 50 mM NaCl 처리구는 38%, 100 mM NaCl 처리구는 15%로 NaCl 처리농도를 증가시킴에 따라 대조구에 비해 뿌리 신장이 억제되었으며, 특히 50 mM 과 100 mM NaCl 처리에서 현저한 신장억제를 보였다. 이것은 염 및 건조 스트레스에 의한 식물체 반응은 1차적으로 뿌리에서 나타나며, 이 때 생성되는 root signal에 의해 뿌리생장 뿐만 아니라 지상부의 생육변화에도 영향을 미친다[14]. 또한, 이러한 root signal은 ABA 생성을 유도하여 잎의 기공의 개폐 뿐만 아니라 잎의 생성유도 및 신장 등을 조절하게 된다[16]. 한편, 내염성 작물로 알려진

보리의 경우는 50 mM, 100 mM, 150 mM NaCl를 Hoagland 용액에 넣고 파종 후 10일간 생육시킨 보리 유묘에 직접 관주하여 그 뿌리 신장을 확인한 결과, 100 mM NaCl 농도까지는 크게 변화를 보이지 않았으며 뿌리 수 또한 큰 영향을 받지 않았다[2]. 본 실험의 결과는 염에 강한 보리에 비해 벼 식물체는 50 mM NaCl이라는 상대적으로 낮은 농도에서도 생육저해가 일어나는 염 민감성 작물로 벼의 생육저해는 일차적으로 지하부의 감소와 같은 형태적인 변화에 기인되는 것으로 사료된다.

**건조 및 염 처리에 따른 근단 구조의 변화**

건조 및 염 처리를 한 고체배지에서 치상 후 5일간 생육시킨 벼 식물체의 근단을 채취하여 처리에 따른 구조적인 변화를 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 2). 4% PEG 처리한 벼 식물체의 근단 표피세포 및 외피층 세포에서 화살표로 나타낸 것과 같이 methyl-lignin의 축적이 관찰되었으며 또한 수분결핍을 극복하기 위한 기작으로 표피세포를 변형시킨 근모의 발생이 관찰되었다(Fig. 2B). 한편, 100 mM NaCl을 처리한 벼 식물체의 근단 표피세포에서도 근모의 발생이 관찰되었으나, PEG 처리구와는 달리 근단 외피층 세포에서만 methyl-lignin의 축적이 확인되었으며 고농도의 NaCl에 의한 세포의 수축도 관찰되었다(Fig. 2C). 염 스트레스를 받은 식물체의 뿌리에서는 세포벽의 구성물질인 셀룰로오스 함량이 감소하며 NaCl 농도가 높아질수록 그 감소의 폭은 증가하는데 이것은 세포에 축적된 Na<sup>+</sup>과 Cl<sup>-</sup>이 셀룰로오스 함량을 감소시켜 세포막과 세포벽을 약화시키거나 변형시켰기 때문으로 생각된다[2]. 본 실험에서 PEG 처리구에 비해 NaCl 처리구의 뿌리생육의 저해는 Na<sup>+</sup>과 Cl<sup>-</sup>와 같은 이온에 의한 표피세포의 세포벽 약화에 기인하는 것으로 사료된다. 이러한 현상에 대해 Nible과 Rogers[11]도 식물체는 흡수된 Na<sup>+</sup>과 Cl<sup>-</sup>을 액포에 저장시켜 세포내의 수분포텐셜을 낮추지만,

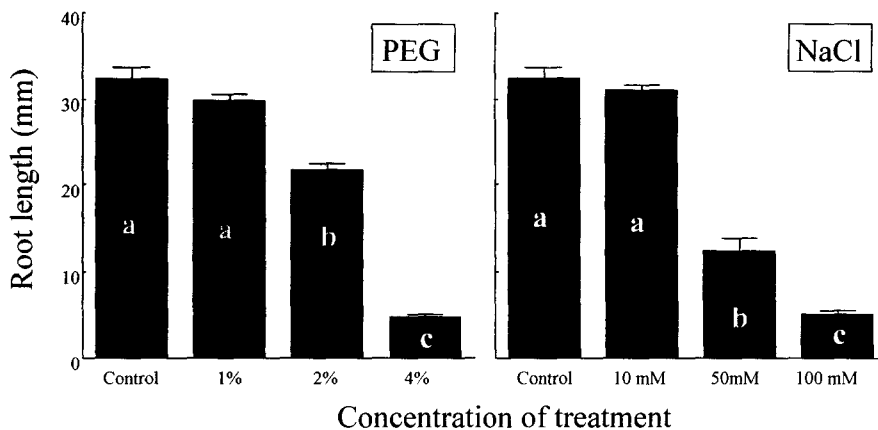


Fig. 1. Difference in root length of Dongjinbyeo grown for 5 days in PEG- and NaCl-treated agar medium conditions. PEG; PEG-treated plants, NaCl; NaCl-treated plants. Each value is mean ± SE (n = 10 individual plants). Column with different letters for each treatment indicate significant difference at 5% level.

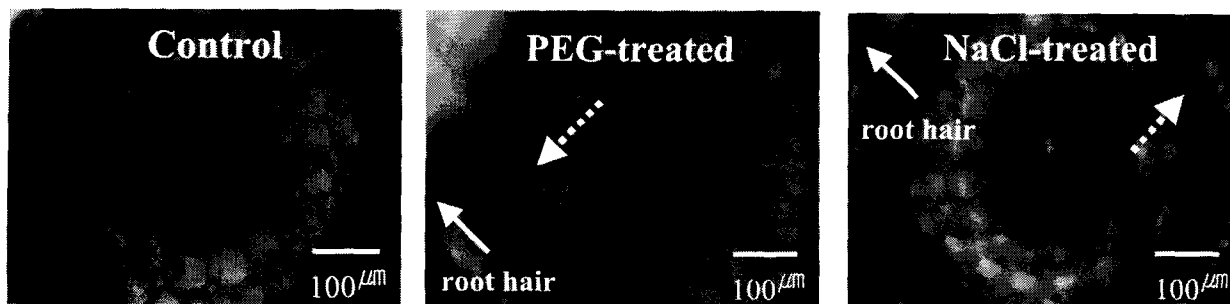


Fig. 2. Microscopic observation of cross section at the distance of 2 mm root tips of rice plants. Plants were grown for 5 days in agar medium containing 4% PEG and 100 mM NaCl. Dotted- arrows indicate accumulation of methyl-lignin.

Table 1. Effects of various NaCl and PEG treatment groups on the dry weight and TR ratio in Dongjinbyeo (n=10)

Treatment	Absolute basis		Normalized basis**		T/R ratio
	Dry weight (mg plant-1)		(%)		
	Shoot	Root	Shoot	Root	
Control*	1.27a	1.17a	100	100	1.09f
1% PEG	1.03b	0.47bc	81	40	2.19d
2% PEG	1.00b	0.37c	79	32	2.70b
4% PEG	0.13e	0.17d	10	15	0.76g
10 mM NaCl	0.98b	0.53b	77	45	1.85e
50 mM NaCl	0.78c	0.33c	61	28	2.36c
100 mM NaCl	0.58d	0.20d	46	17	2.90a
Mean	0.82	0.46			1.98

Within a column, means not followed by the same letter are significantly different at the 5% level by DMRT.

\*The plants grown in the absence of NaCl and PEG.

\*\*Normalized basis means the percentage ratio to the control.

과도한 염류 축적에 의해 이온독성 및 무기양분 부족으로 생육장애를 일으킨다고 보고하였다.

**건조 및 염 처리에 의한 건물 생산량의 변화**

PEG 및 NaCl을 처리한 고체배지에 치상 후 5일간 생육시킨 동진벼의 건물 생산량을 지하부와 지상부로 나누어 조사하였다(Table 1). PEG 및 NaCl 처리에 의한 건물생산은 지상부와 지하부에서 모두 억제되었다. PEG 처리에 따른 지상부의 상대 건물중(%)은 1% PEG 처리구에서 81%, 2% PEG 처리구에서 79%, 4% PEG 처리구에서 10%로 감소한 반면, 지하부의 상대 건물중은 1% PEG 처리구에서 40%, 2% PEG 처리구에서 32%, 4% PEG 처리구에서 15%를 나타내었다. 한편, NaCl 처리에 의한 건물 생산량은 PEG 처리구 식물체와 마찬가지로 벼 식물체의 지상부와 지하부 모두에서 생육의 억제가 관찰되었다. NaCl 처리에 의한 지상부의 상대 건물중(%)은 10 mM NaCl 처리구에서 77%, 50 mM NaCl 처리구에서 61%, 100 mM NaCl 처리구에서 46%를 나타내었고 지하부의 상대 건물중은 10 mM NaCl 처리구에서 45%, 50 mM NaCl 처리구에서 28%, 100 mM NaCl 처리구에서 17%

로 현저한 건물생산 저해를 보였다. 일반적으로 염 및 건조 스트레스 환경에서의 낮은 수분 결핍으로 인해 기공이 폐쇄되어 CO<sub>2</sub> 흡수가 저해된 결과, 광합성율의 감소로 인해 물질생산의 저하가 보고되어 있으나[3], 본 실험에서 건물생산의 저하는 Spollen 등[14]의 보고와 같이 NaCl 및 PEG 처리에 의한 벼 식물체 뿌리에서 root signal이 생성되어 ABA와 같은 생장억제 호르몬을 유도하여 지하부 뿐만 아니라 지상부의 물질생산에 영향을 주어 결과적으로 건물 생산량이 감소한 것으로 사료된다.

지금까지의 스트레스 생리학 관련 연구에는 주로 양액 재배법이 이용되고 있을 뿐, 고체 배지를 이용한 실험법은 거의 이용되지 않고 있다. 이러한 고체배지의 이용은 공간적인 효율성을 높일 수 있을 뿐만 아니라 발아기의 스트레스에 대한 식물체 반응의 관찰과 내성 특성의 검정에 유용하다고 사료된다.

**요 약**

본 실험은 고체배지를 이용한 새로운 실험방법을 이용하여

건조 및 염 스트레스에 대한 식물체의 형태학적인 특성을 뿌리신장률, 근단구조, 물질생산 등의 측면에서 조사하였다. PEG 및 NaCl 처리조건에서 처리 농도가 증가할수록 벼 식물체의 뿌리신장이 현저하게 저하되었으며, PEG 및 NaCl 처리에 따른 벼 식물체의 뿌리는 methyl-lignin 축적에 의한 리그닌화가 진행되었으며, 수분결핍을 극복하려는 기작으로 표피세포를 변형시킨 근모의 발생이 관찰되었다. 또한 PEG 및 NaCl 처리에 의한 벼 식물체의 지상부와 지하부의 건물생산량의 현저한 감소는 지상부보다 지하부에서 뚜렷하였으며, 그 결과 PEG 및 NaCl 처리농도를 증가시킴에 따라 TR율의 증가를 보였다. 상기의 결과로부터 건조 및 염 처리를 한 고체배지를 이용함으로써 벼의 경우 스트레스 처리 전 약 2주간 유묘를 생육시키는 양액재배에 비해 발아기의 각종 스트레스에 대한 식물체 반응의 관찰과 내성 특성 검정에 유용할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음. (KRF-2000-005-G00002).

### 참고 문헌

- Chaves, M. M., J. S. Pereira, J. Maroco, M. L. Rodrigues, C. P. P. Ricardo, M. L. Osorio, I. Carvalho, T. Faria and C. Pinheiro. 2002. How plants cope with water stress in field: Photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* **89**, 907-916.
- Cho, J. U., C. S. Kim, S. Y. Lee and K. S. Park. 1998. Growth and histological characteristics of barley (*Hordium vulgare* L.) seedling to NaCl stress. *Kor. Environ. Agric.* **17**, 335-340.
- Cornic, G. and C. Fresneau. 2002. Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Ann. Bot.* **89**, 887-894.
- Jagtap, V., S. Bhargava, P. Streb and J. Feierabend. 1998. Comparative effects of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Exp. Bot.* **49**, 1715-1721.
- Jia, W., J. Zhang and J. Liang. 2001. Initiation and regulation of water deficit-induced abscisic acid accumulation in maize leaves and roots: cellular volume and water relations. *J. Exp. Bot.* **52**, 295-300.
- Kataoka, T., M. Mori, T. M. Nakanishi, S. Matsumoto and A. Uchiumi. 1997. Highly sensitive analytical method for aluminum movement in soybean root through lumogallion staining. *J. Plant Res.* **110**, 305-309.
- Lee, S. G., Y. W. Seo, J. W. Johnson and B. H. Kang. 1997. Effect of water stress on leaf water potential, photosynthesis and root development in tobacco plant. *Kor. J. Crop Sci.* **42**, 146-152.
- Lee, S. G., S. S. Shin, Y. S. Seok and G. K. Bae. 1998. Effects of salt stress on photosynthesis, free proline content and ion content in tobacco. *Kor. Environ. Agric.* **17**, 215-219.
- Nakamura, M., H. Takahashi, T. Tabuchi, K. Kanahama and A. Karasawa. 2002. Method of cell and tissue experiments. pp. 42-64. In Hashiba, T. and K. Kanahama (eds.), *A manual of experiments for agriculture*. Soft Science Publications, Tokyo.
- Nakanishi, T. M., K. Tanoi, H. Yokota, D. J. Kang, R. Ishii, S. S. Ishioka, S. Watanabe, A. Osa, T. Sekine, S. Matsushashi, T. Ito, T. Kume, H. Uchida and A. Tsuji. 2001. <sup>18</sup>F used as tracer to study water uptake and transport imaging of a cowpea plant. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **249**, 503-507.
- Nible, C. L. and M. E. Rogers. 1992. Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. *Plant Soil* **146**, 99-107.
- Nichol, B. E., L. Oliveria, A. D. M. Glass and M. Y. Siddiqi. 1991. The effects of short and long term aluminum treatment on potassium fluxes in roots of an aluminum sensitive cultivar of barley. *Dev. Plant Soil Sci.* **45**, 741-746.
- Raymond, M. J. and N. Smirnov. 2002. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. *Ann. Bot.* **89**, 813-823.
- Spollen, W. G., M. E. LeNoble, T. D. Samuels, N. Berstein and R. E. Sharp. 2000. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol.* **12**, 967-976.
- Yang, J., J. Zhang, Z. Wang, Q. Zhu and W. Wang. 2001. Hormonal changes in the grains of rice subjected to water stress during grain filling. *Plant Physiol.* **127**, 315-323.
- Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 248-273.