

# 현미경 기술을 활용한 과수 연구

중앙대학교 식물생명공학전공

박희승

# 발표순서

- I. 서언
- II. 광학현미경 검경용 시료 준비
- III. 과수에서의 연구 분야 예시
- IV. 결론

# I. 서언

- 과수의 각 기관을 구성하는 조직이나 세포들의 연구에는 실체현미경, 광학현미경, 전자현미경, 공초점 레이저주사현미경 등 다양한 현미경이 이용되고 있음
- 연구자가 관찰하고자 하는 대상에 따라 위의 현미경들은 다시 여러 종류로 세분되며, 각각의 현미경을 사용하기 위한 시료 준비 방법과 염색법 및 절편을 제작하기 위한 microtome에도 많은 종류가 있음
- 다양한 현미경의 용도는 관찰하고자 하는 시료의 크기와 검경 목적에 따라 다르며, 검경을 위한 준비과정과 비용이 적지 않으므로 관찰하고자 하는 대상과 목적을 명확히 하여 실험에 임하여야 함

## II. 광학현미경 검경용 시료 준비

8/23

### ○ 포매 재료에 따른 장단점 비교

|           | Epon method                             | Paraffin method                    |
|-----------|-----------------------------------------|------------------------------------|
| 고정액       | Glutaraldehyde + Osmium tetroxide       | Formaldehyde                       |
| Microtome | Ultramicrotome                          | Rotary microtome                   |
| 절편 두께     | 1 $\mu$ m or 60~70nm                    | 10 $\mu$ m                         |
| 장점        | 높은 해상도<br>하나의 시료로 광학현미경과 전자현미경<br>검경 가능 | 보다 큰 크기의 시료 제작 가능<br>다양한 염색법 사용 가능 |
| 단점        | 염색법이 한정됨                                | 해상도가 낮음<br>전자현미경 검경 불가능            |

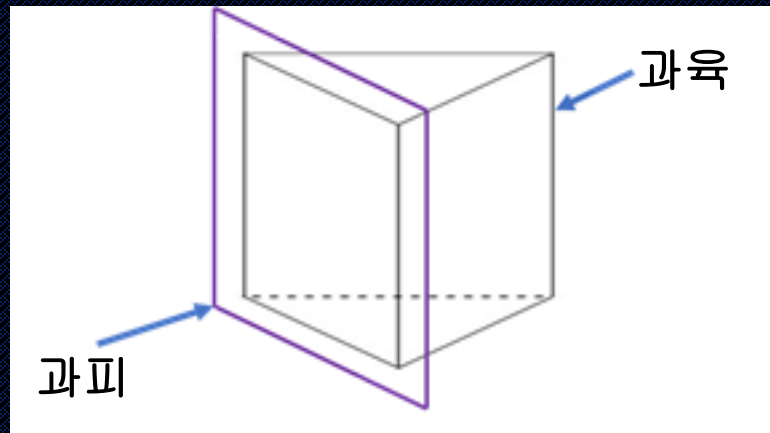
## II. 광학현미경 검경용 시료 준비

4/23

시료채취 → 고정(탈기) → 탈수 → 포매 → 절편 → 염색 → 검경

### 1. 시료 채취 (Sampling)

- ① 가능한한 20개 정도의 블록을 만들 수 있는 시료를 준비한다.
- ② 투과전자현미경(TEM) 뿐만 아니라 광학현미경용 시료도 가급적 작게 채취하는 것이 좋으며, 특히 TEM 에서는  $1 \times 1 \times 1 \text{mm}$  정도로 작게 하는 것이 좋다.
- ③ 방향성이 요구되는 경우에는  $1 \times 1 \times 2 \text{mm}$  정도로 한쪽 방향을 약간 길게 하여야 후에 embedding 과정에서 방향 맞추기가 용이해 진다.
- ④ 신속히 고정액에 담아야 한다.



# 11. 광학현미경 검경용 시료 준비

5/23

## 2. 고정에서 포매까지

### ① 고정 : 저온(냉장고보관)에서 진행

#### - 1차 고정

- Glutaraldehyde(2.5%) : 90분, 4℃(고정액에 담근 후 바로 공기 제거)
- Washing : 0.1M Phosphate buffer(pH7.2), 15분 간격으로 4~5회

#### - 2차 고정

- Osmium tetroxide(1%) : 90분, 4℃
- Washing : 0.1M Phosphate buffer(pH7.2), 20분 간격으로 4~5회
- 0.1M Phosphate buffer에서 over night

### ② 탈수 : 상온에서 진행

40% Ethanol(5분) → 60% Ethanol(5분) → 80% Ethanol(5분) → 90% Ethanol(5분) → 95% Ethanol(5분) → 100% Ethanol(5분) → 100% Ethanol(15분) → 100% Ethanol(15분) → 100% Ethanol(30분)

⇒ Ethanol & Propylene oxide(Epon의 용매, 1 : 1, 15분) → Propylene oxide(15분)

→ Propylene oxide(15분) → Propylene oxide(30분)

⇒ Propylene oxide & Epon : 약 2:1로 섞은 후 최소 1시간 → Propylene oxide와 Epon을 1:1로 섞은 후 최소 1시간 → Epon(DMP30을 넣지 않은 것)에서 overnight

### ③ 포매(embedding) : 상온 + 60℃에서 진행

Epon + DMP30(Epon의 1.5%) : 60℃에서 4일 동안 Hardening

## 3. 절편제작 (Sectioning)

- ① 포매된 block을 trimming 한다.
- ② Ultramicrotome을 사용하여 전자현미경  
검경용은 60~70nm, 광학현미경 검경용은  
1 $\mu$ m의 두께로 절편을 제작한다.



## 4. 염색(PAS 염색법)

- ① Periodic acid( $H_5IO_6$ )용액 : 30분
- ② 증류수로 10분간 2~3회 Washing
- ③ Schiff's Reagent : 15분
- ④ Sodium bisulfite 용액 : 15분
- ⑤ 흐르는 물에 30분간 세척



## 5. Histomount를 이용하여 cover glass를 씌움

## 6. 현미경 검경

7/23



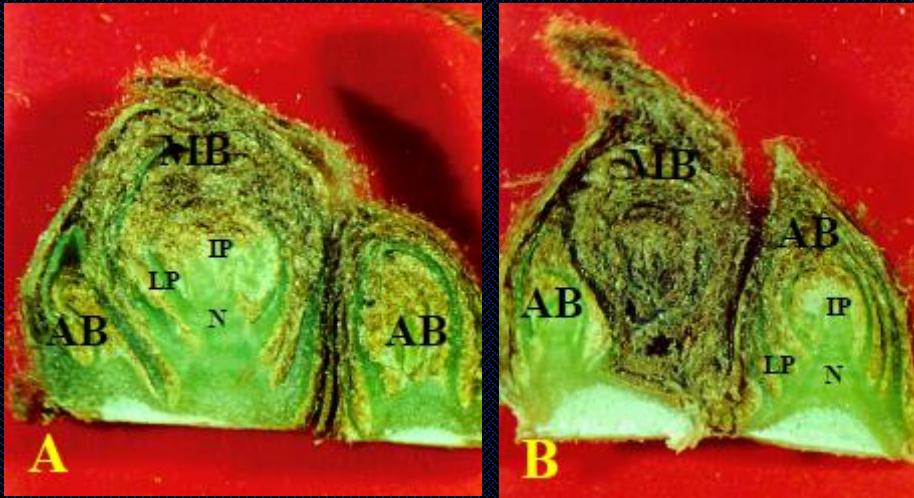
실체현미경



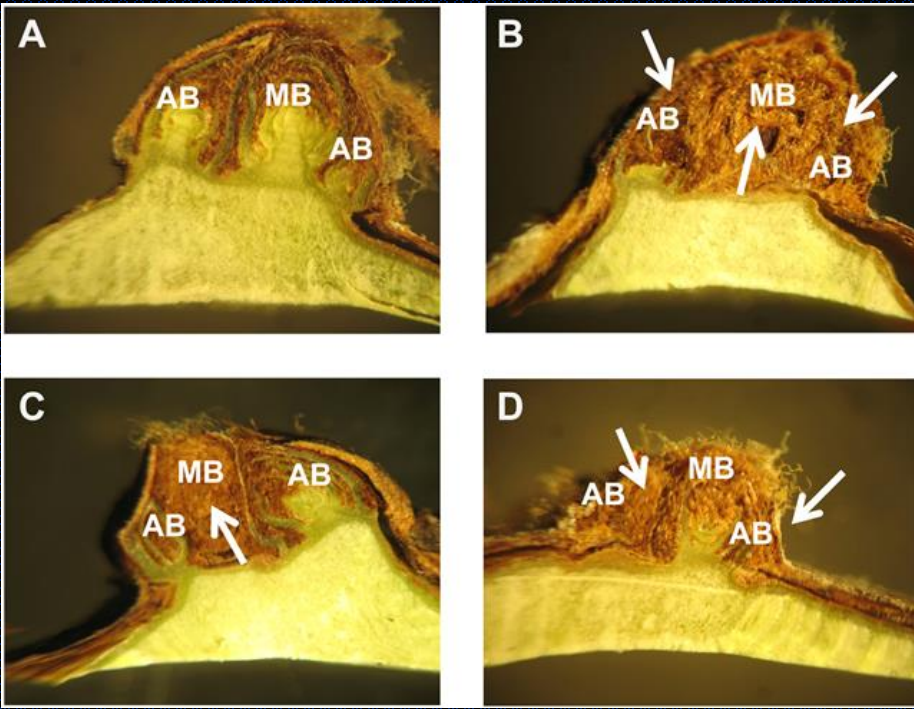
광학현미경

# III. 과수에서의 연구 분야 예시

## ◆ 실체현미경을 이용한 연구



Sound axillary bud (A) and main bud necrosis of axillary bud (B) in 'Campbell Early' grapevines. AB, accessory bud; IP, inflorescence primodium; LP, leaf primodium; MB, main bud, N, node.  
(최인명 · 이창후 · 홍윤표 · 박희승, 2007. Kor. J. Hort. Sci. Technol.)



The necrosis types of bud observed by stereomicroscope in 'Hongisul' grapevine. A: normal bud, B: whole bud necrosis, C: main bud necrosis, D: accessory bud necrosis. MB: main bud, AB: accessory bud. Arrows (→) indicate the necrosis part.  
(김은주 · 이별하나 · 권용희 · 신경희 · 정규환 · 박서준 · 박희승, 2011. Kor. J. Hort. Sci. Technol.)

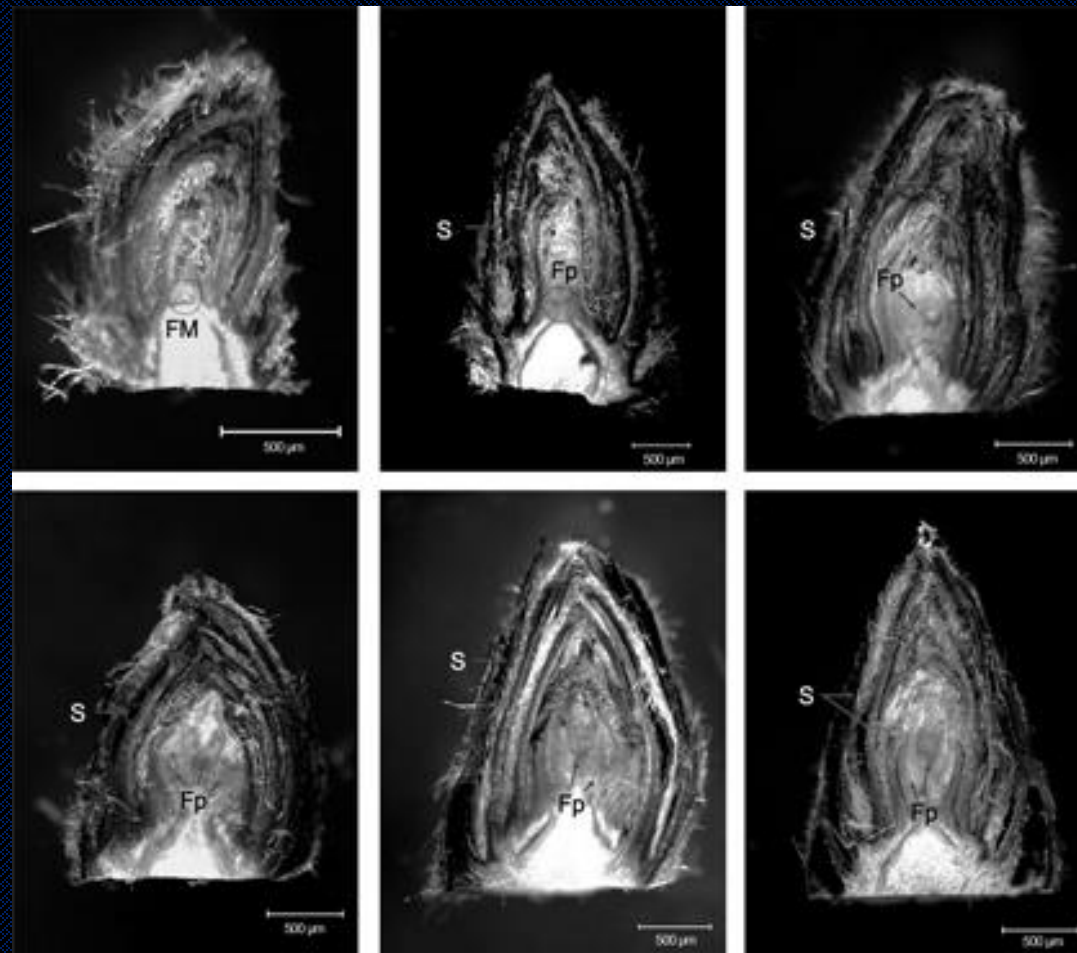


Fig. 3. Cross section of floral bud in 'Fuji' apple trees at 75 (A), 150 (B), 210 (C), 240 (D), 270 (E), and 300 (F) days after full bloom.

FM, floral meristem; S, scales; Fp, flower primordium; Scale bars = 500  $\mu$ m.

(이별하나 · 박요섭 · 박희승. 2015. Kor. J. Hort. Sci. Technol.)

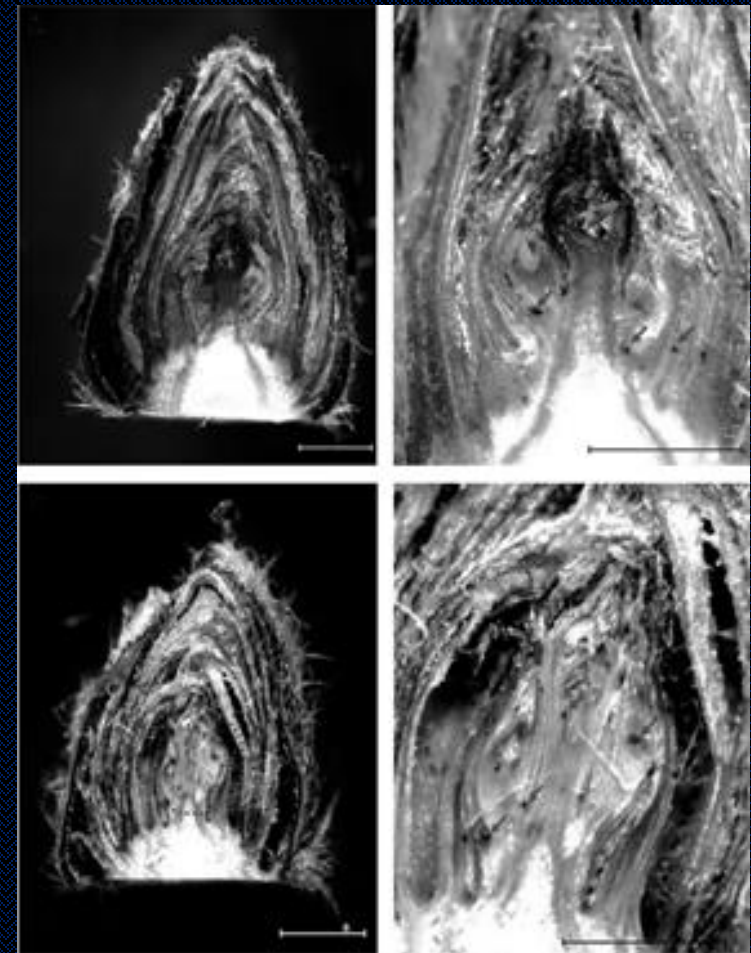
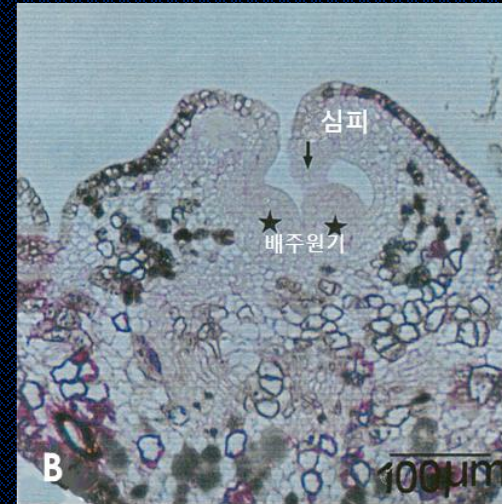
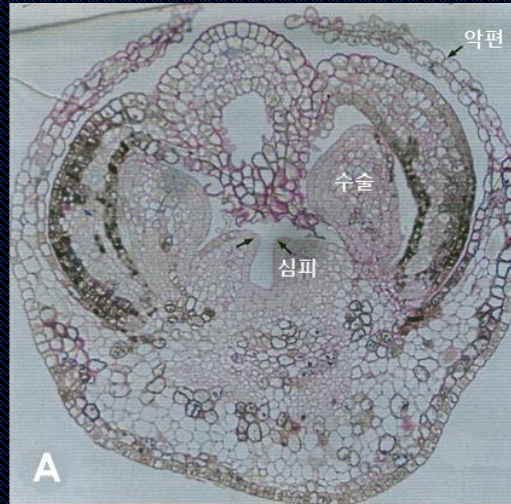


Fig. 4. Cross section of floral bud necrosis in 'Fuji' apple trees at 255 (A, A') and 300 (B, B') days after full bloom.

Arrows indicate necrotic spots. Scale bars = 500  $\mu$ m.

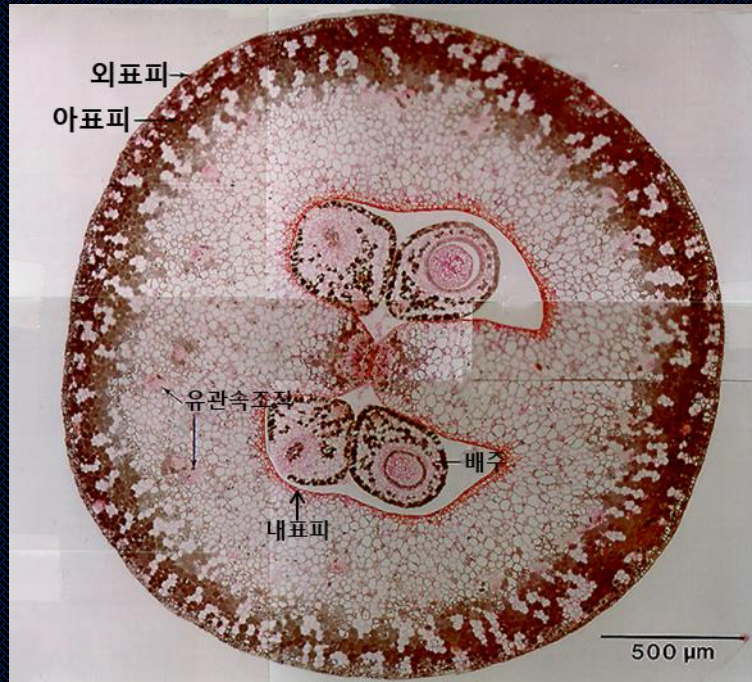
7월 중순경부터 분열조직이 비대하여 돌기모양으로 솟아 오른 형태가 관찰되어 이 시기에 영양생장으로 부터 생식생장으로의 전환이 이루어지는 것을 알 수 있음(Fig. 3A). 9월에는 중심화의 화원기가 뚜렷하게 관찰됨(Fig. 3B). 중심화의 원기가 관찰된 후 약 90일 정도 지난 12월에 최소 3개 이상의 화원기가 형성되어 있음(Fig. 3D). 12월은 내재휴면 심도가 최대에 도달한 시기임이 밝혀져 내부의 구조적인 변화가 거의 없을 것으로 생각되었으나, 내부적인 발달은 지속되고 있음을 알 수 있음(Fig. 3F). 따라서 'Fuji' 사과와 내재휴면은 꽃의 원시세포(flower primordium)가 형성되는 시기에 시작되어 수술을 포함한 꽃의 내부 구조물이 형성된 이후 타파됨을 확인함. 휴면 기간 동안 대부분 눈이 건전하게 생존해 있으나 일부에서 화원기의 괴사 현상이 나타남(Fig. 4). 꽃눈 괴사 시 냉각 또는 서리에 의한 피해는 저온에 직접적인 영향을 받기보다는 주로 얼음 결정 형성에 의해 발생하며, 얼음 결정이 발생하는 위치에 따라 세포의 피해 유무가 달라진다고 알려져 있음.



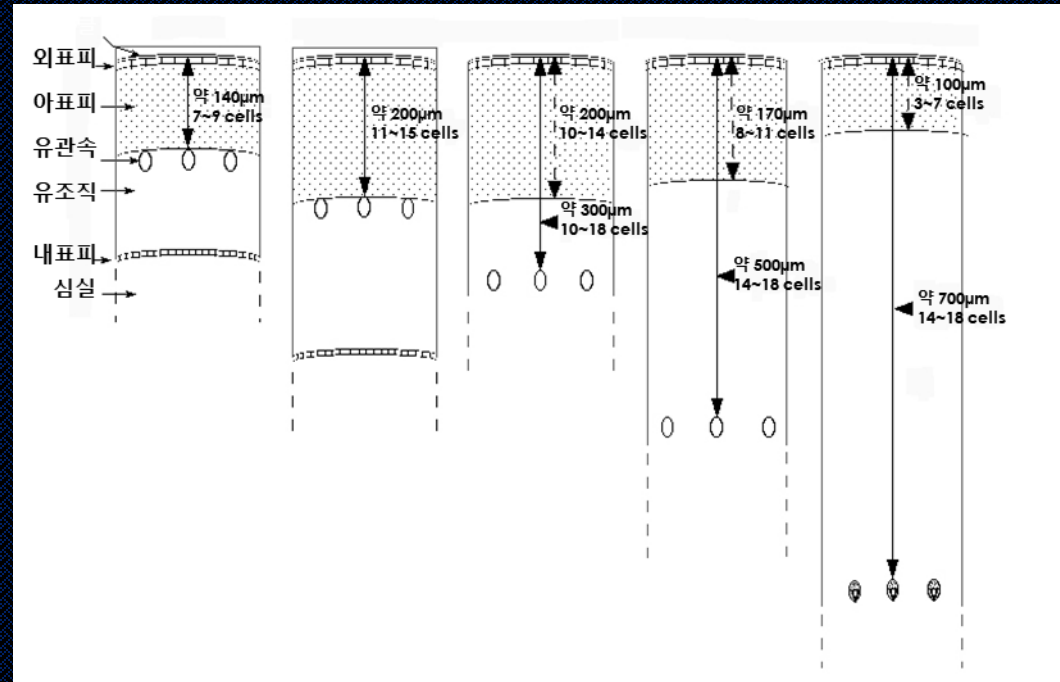
포도에서 암술이 형성되는 과정. 포도는 2개의 심피가 융합하여 1개의 자여를 이루는 합생자여로써 2개의 심피가 융합하여 2개의 심실을 형성하나 융합되지 않는 부위에서는 갈라진 틈이 나타난다.

**A** ; 가장 바깥쪽으로부터 약편, 화판, 수술이 발달하면서 가장 안쪽에 2개의 심피가 형성되는 초기 단계. **B** : 심피가 점점 성장하면서 안쪽으로 배주의 원기가 형성된다. **C** : 심피가 화축방향으로 자라면서 2개의 심피가 맞닿을 듯이 가까워짐. **D** : 안쪽으로 자라던 심피가 융합하면서 암술의 아래쪽으로 성장하여 2개의 심실을 형성함.

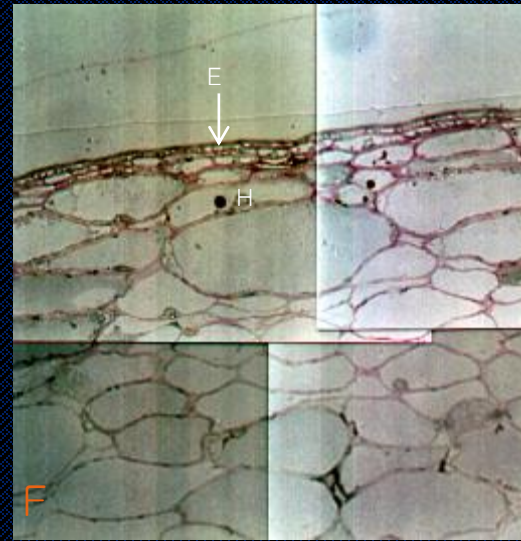
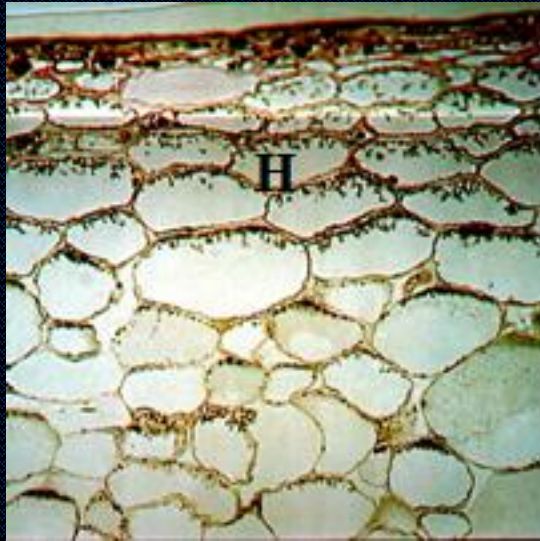
(BENHARBIT EL ALAMI Naïma. 1995)



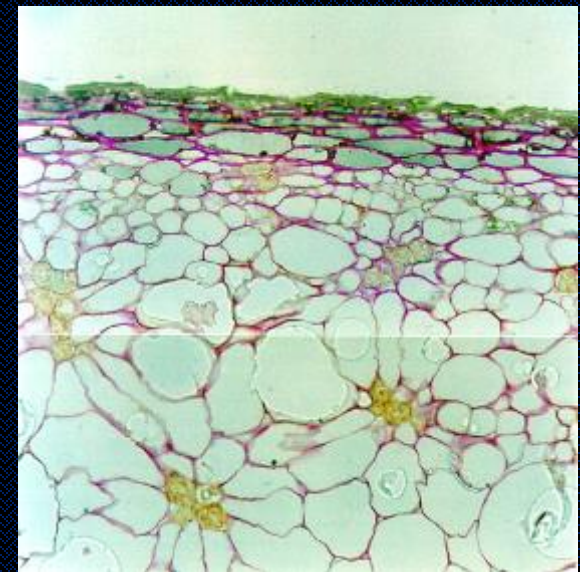
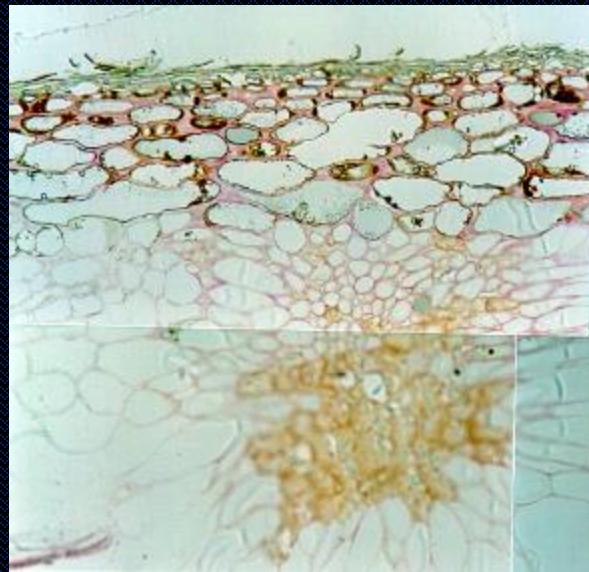
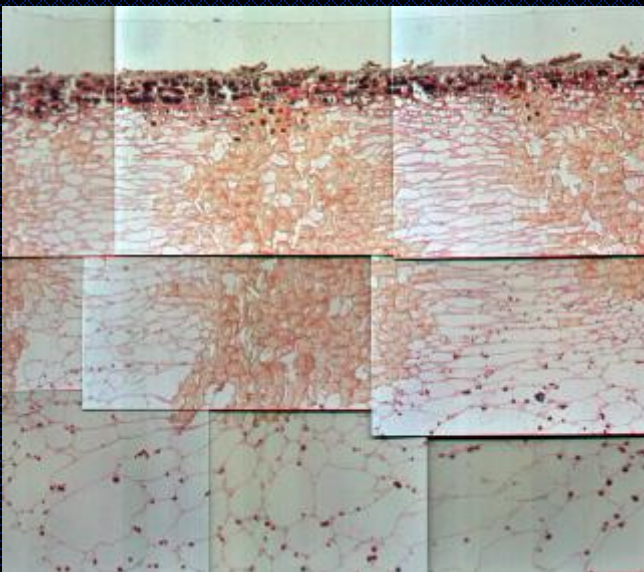
Merlot. Très jeune baie quelques jours après la nouaison.



Position des faisceaux conducteurs et importance relative des différents tissus pendant le développement de la baie (M. FOUGÈRE-RIFOT, H.-S. PARK, J. BOUARD. 1993. J. Int. Sci. Vigne Vin)



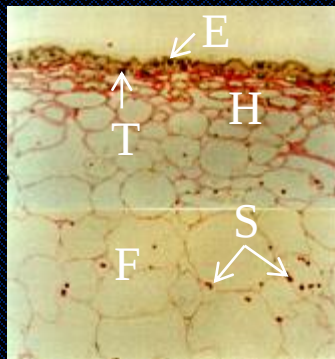
포도 품종의 성숙기 과실 조직(좌 : 캠벨얼리, 우: 거봉)



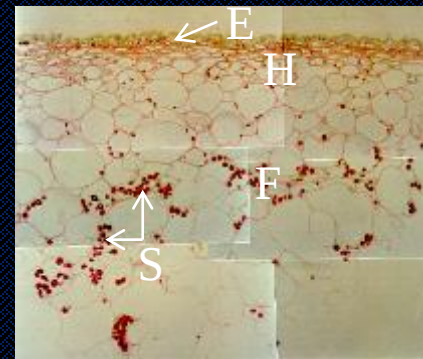
배 품종의 성숙기 과실 조직(좌 : 화산, 중 : 신고, 우 : 황금배)



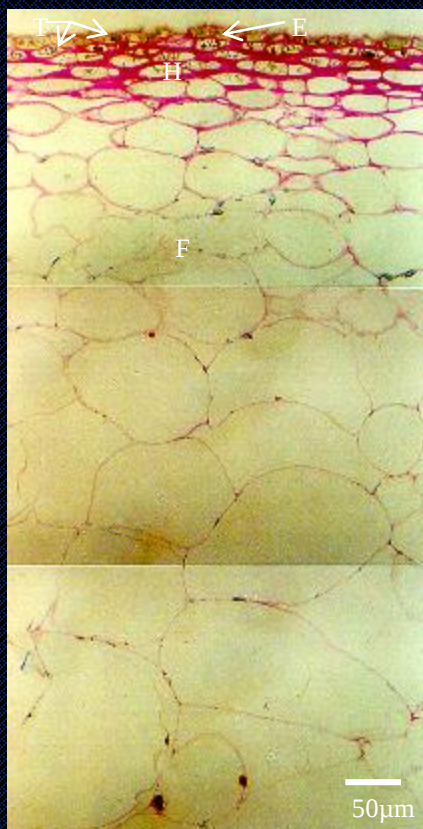
감홍 품종의 반점성 장해



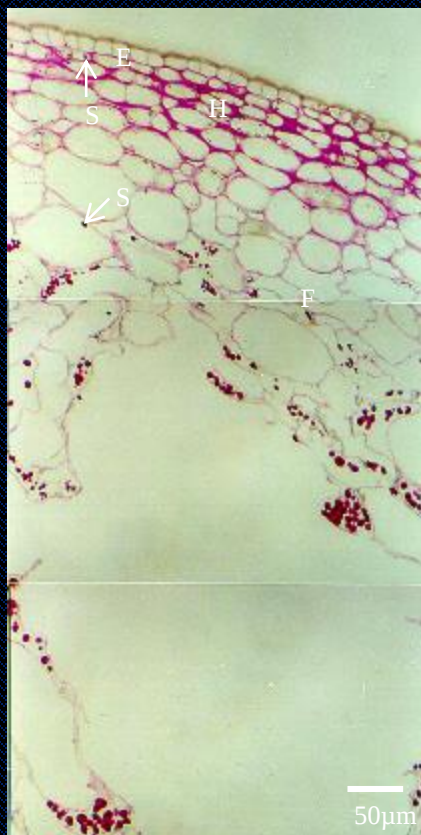
정상조직



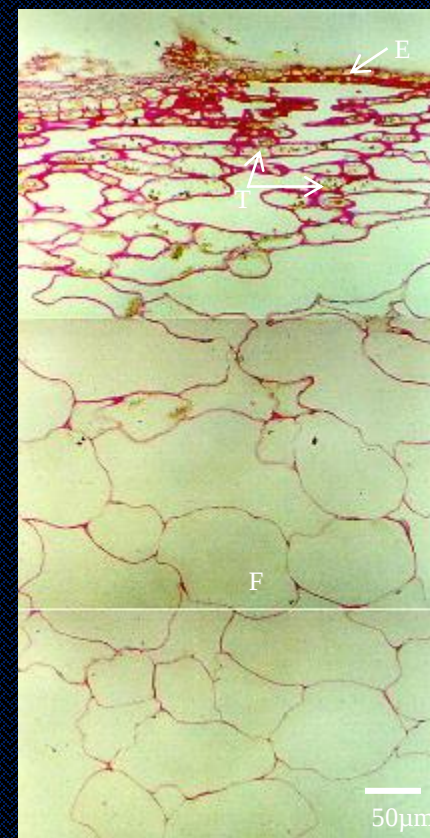
반점부위



Cross section of 'Tsugaru' apple fruit in maturity

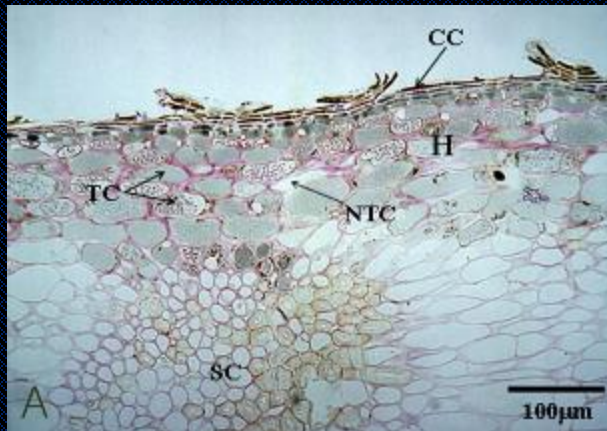


Cross section of the pitted tissue in 'Tsugaru' apple

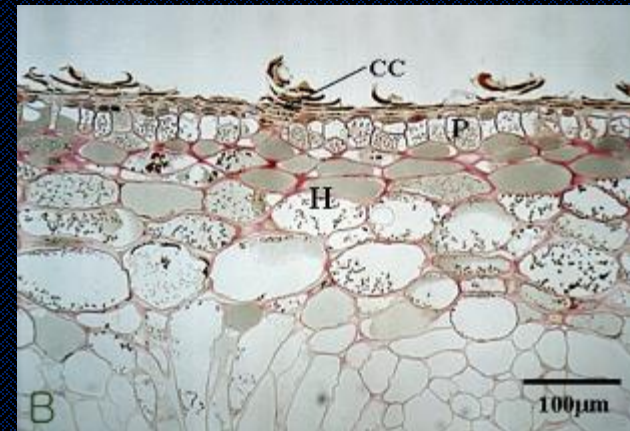


Cross section of the cork tissue in 'Tsugaru' apple

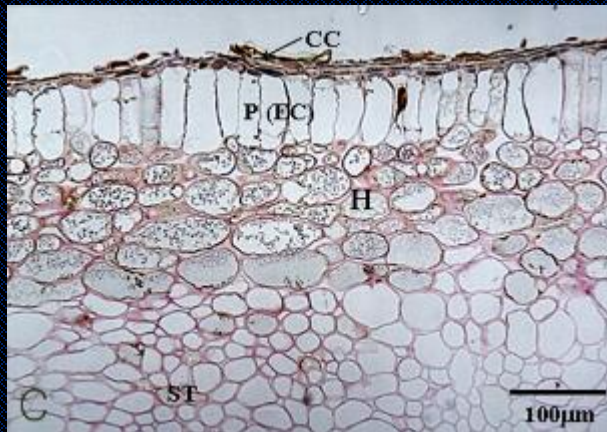
Abbreviation; E : Epidermis, F : Flesh, H : Hypodermis, S : Starch Grain, T : Tannin



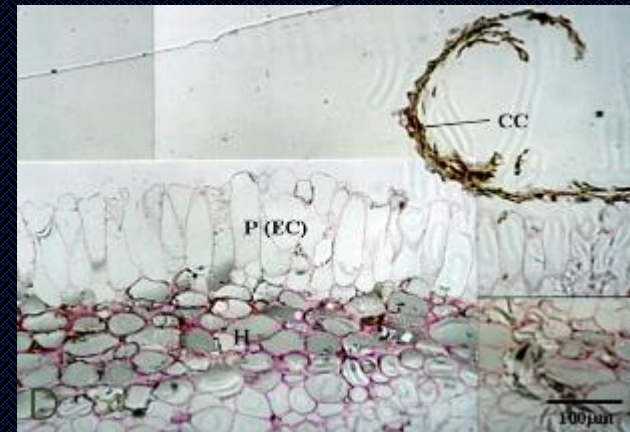
Before the initiation of the disorder



Initial stage



Mid stage



Final stage

Fig. 3. Developing procedure of peeling-off disorder on 'Niitaka' pear from harvest to 120 days of storage. A: harvest time on 'Niitaka' pear fruit skin; B: initial stage on peeling-off disorder; C: mid stage on peeling-off disorder; D: final stage on peeling-off disorder.

CC, cork cell; H, hypodermis; NTC, non-tannin cell; P, phellogen; P (PE), phellogen (elongated cell); SC, stone cell; TC, tannin cell.

(Yoon-Pyo Hong, Seung-Koo Lee, Youn-Moon Park and Hee-Seung Park. 2008. J. Japan. Soc. Hort. Sci.)

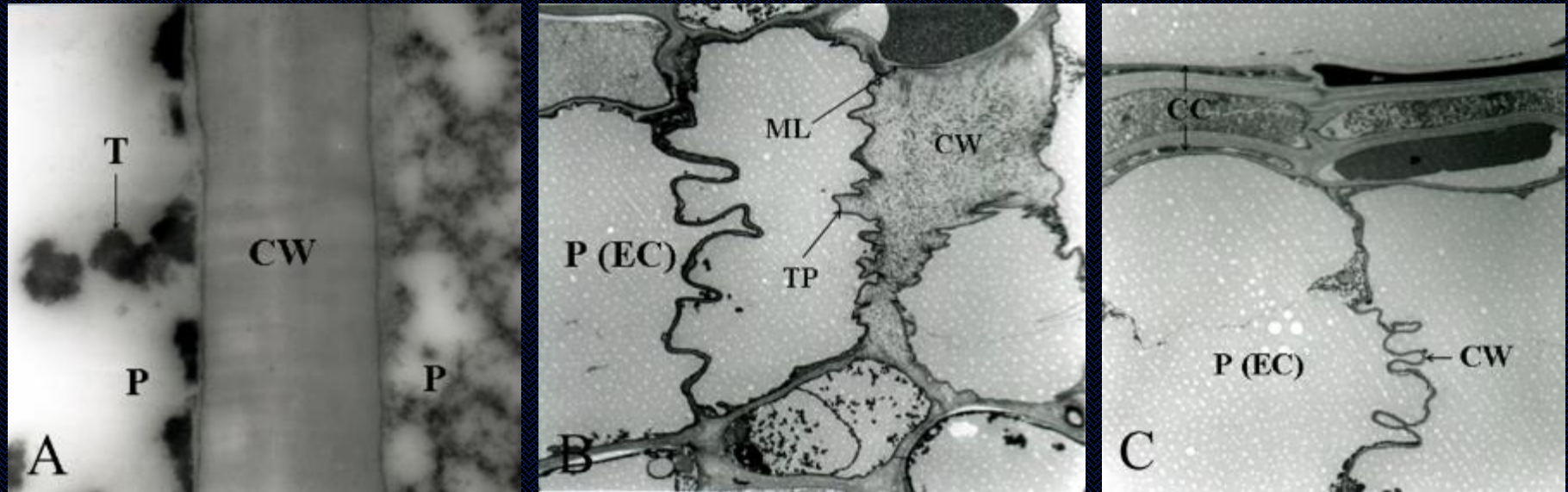
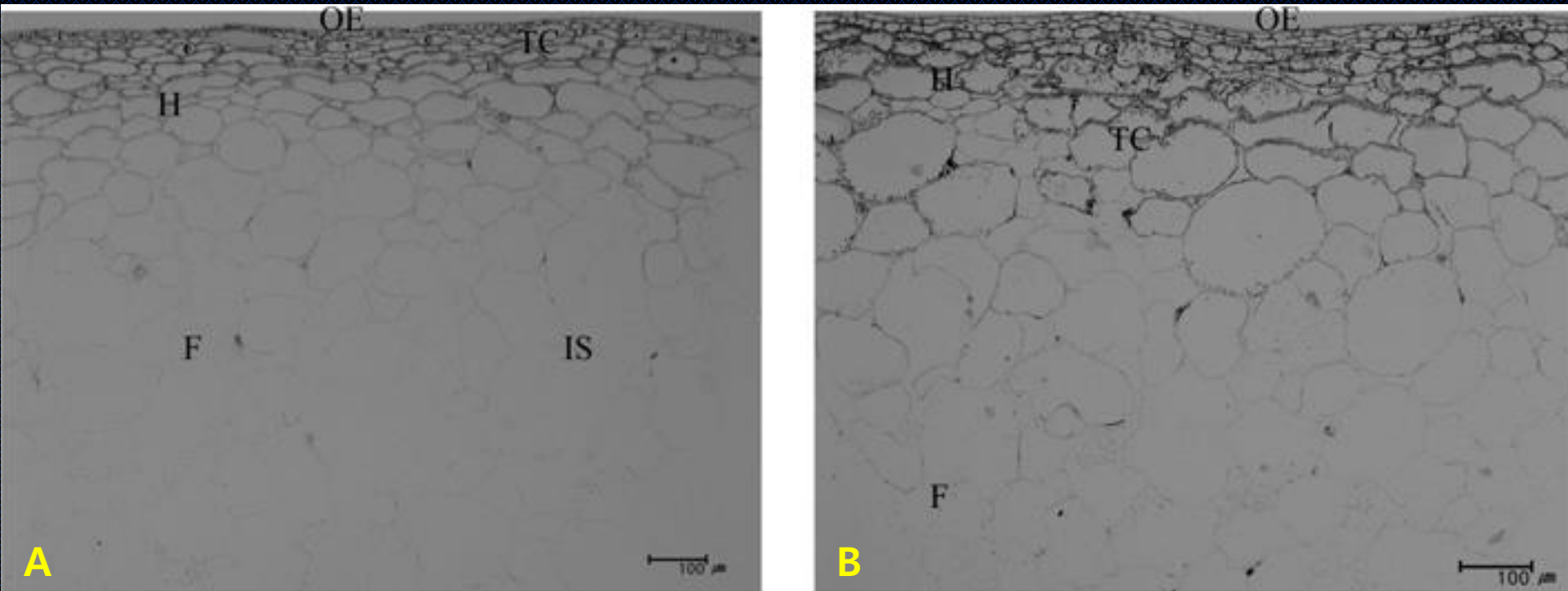


Fig. 5. Transmission electron micrograph of the sound (A, x27,800), collapsed (B, x1,670) and the thinned cell wall (C, x1,670) in peeling-off disorder of 'Niitaka' pear.  
 CC, cork cell; CW, cell wall; ML, middle lamella; P, phellogen; P (EC), phellogen (elongated cell); TP: tonoplast.



Morphological structure at 90 days after full bloom of 'Heukboseok' grape treated with GA<sub>3</sub> and TDZ.

(A) non-treated; (B) primary and secondary 25 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 2.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ

F: flesh; H: Hypodermis; IS: Intercellular space; OE: Outer epidermis, TC: Tannin cell.

(정명희, 이별하나, 박요섭, 오진표, 김희섭, 박희승. 2015. Kor. J. Hort. Sci. Technol.)

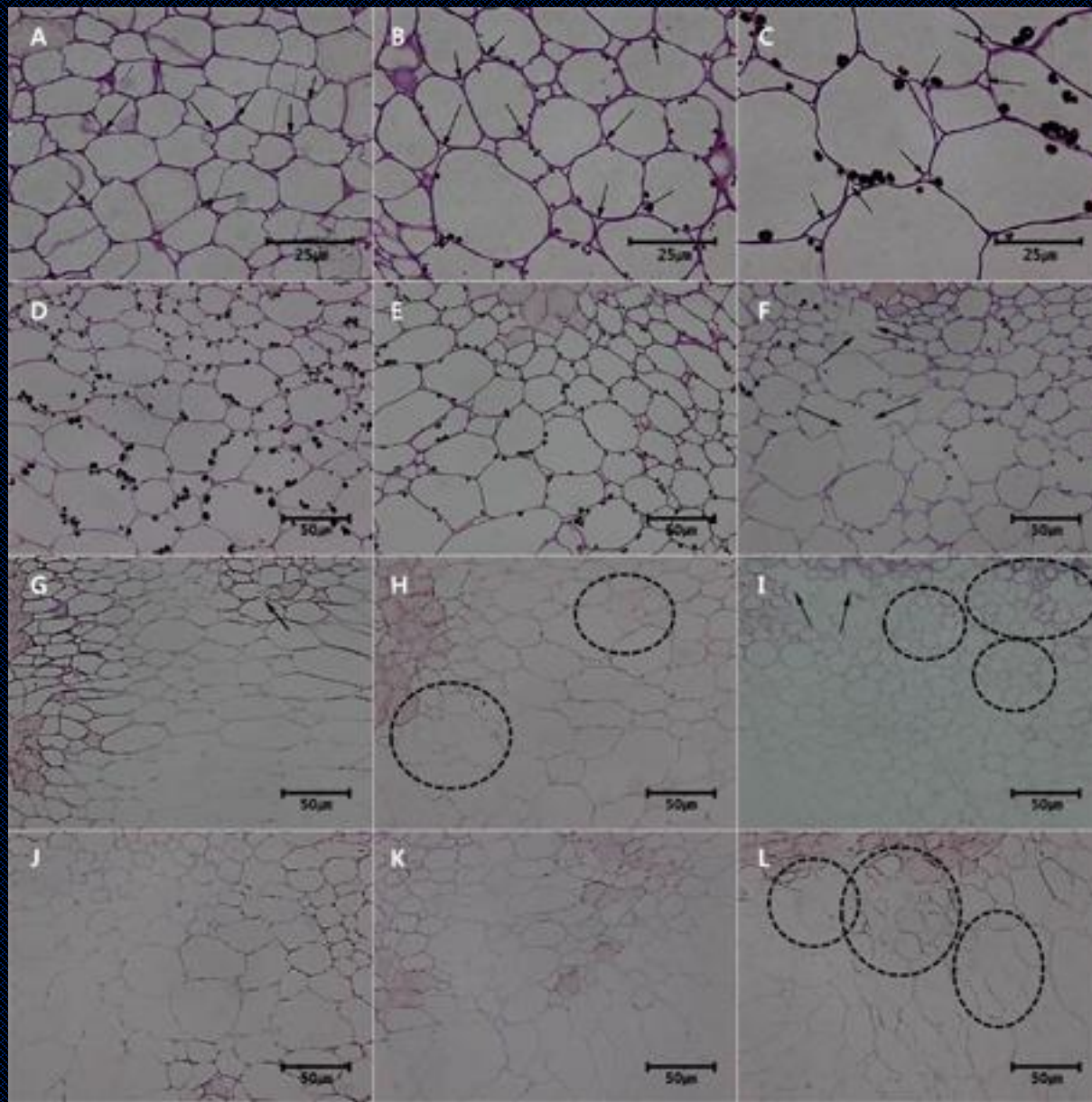


Fig. 2. Structural changes in flesh tissue as a cause of softening. A to C are respective pictures of fruit flesh at 30, 70, and 110 days after full bloom, which shows that the increase in intercellular space occurs primarily due to cell expansion. D to F show fruit flesh harvested 120, 130, and 140 days after full bloom, respectively. G to I show the flesh of fruits stored at room temperature for 20 days after harvesting at 120, 130, 140 days after full bloom. J to L show the flesh of fruit stored at low temperature for 70 days after harvesting at 120, 130, and 140 days after full bloom.

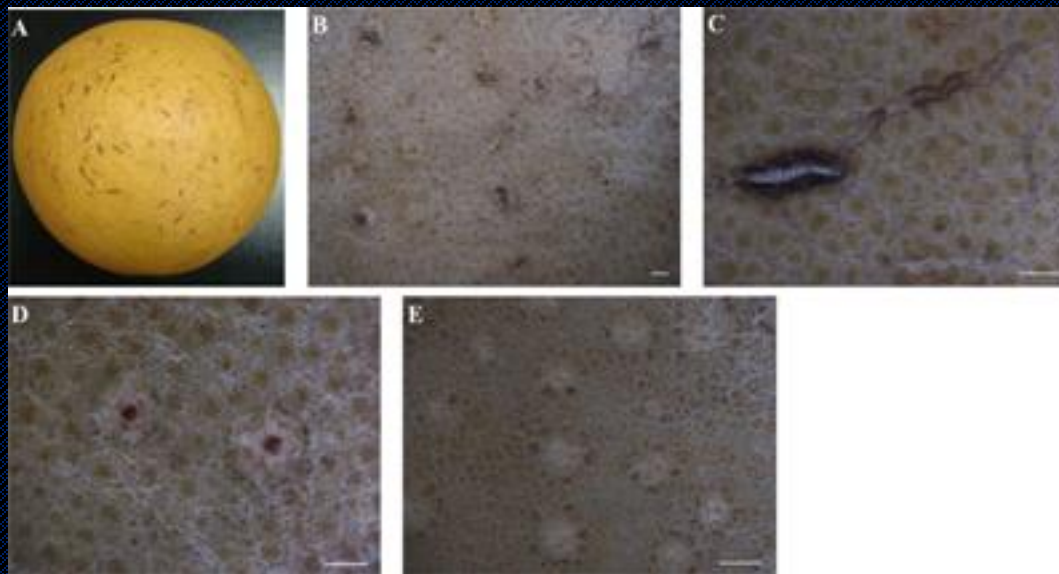


Fig. 1. Cracking on surface of Mansoo pears. Distribution of cracks through fruit surface (A), occurrence of short-length-shaped cracking (SLSC) on the lenticel (B), enlargement of cracks (C), normal surface of the Mansoo pear (D) and normal surface of the Niitaka pear (E). Scale bar = 1 mm.

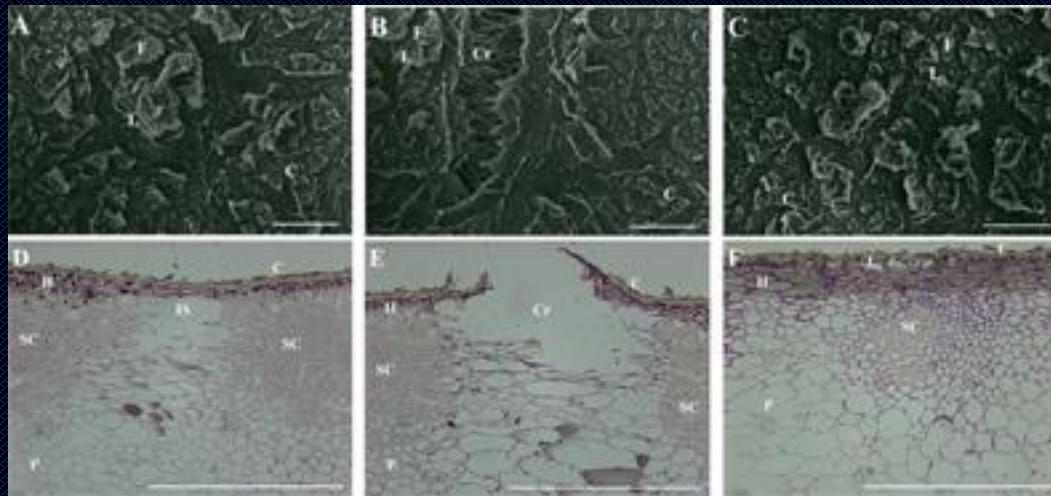
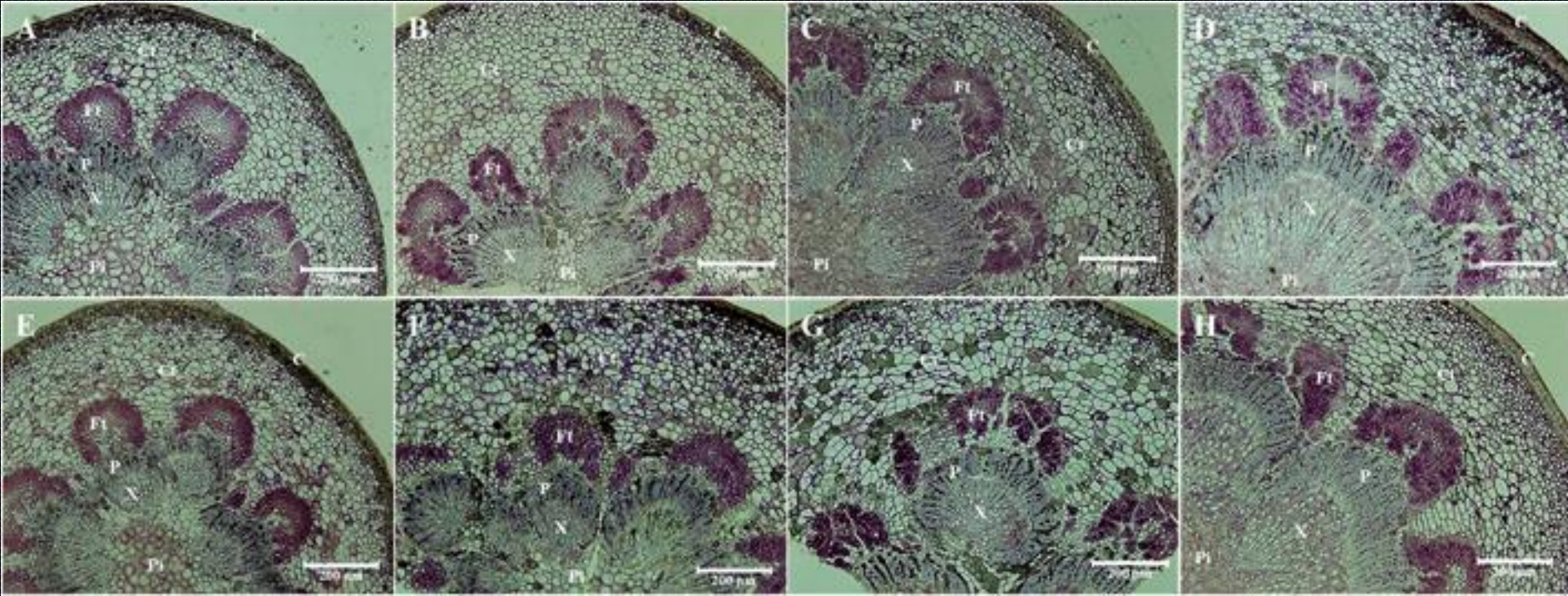


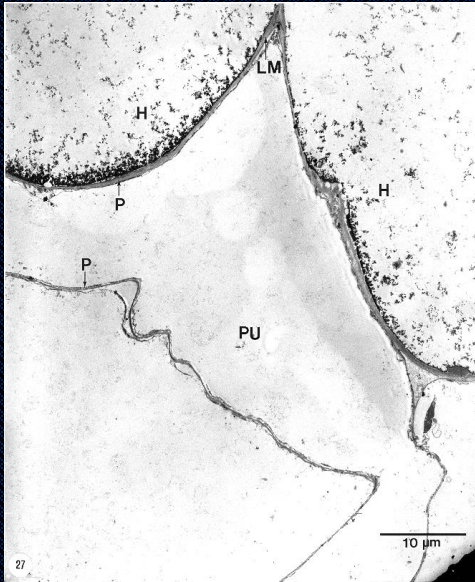
Fig. 3. Surface and transverse section of Mansoo and Niitaka pear peel at maturity observed by SEM (A–C) and LM (D–F). Normal (A, D) and cracked region (B, E) of Mansoo fruit and normal region of Niitaka (C, F). C, cork tissue; Cr, crack; F, filling tissue; H, hypodermis; IS, intracellular space; L, lenticel; P, parenchyma; SC, stone cell. Scale bar = 500  $\mu$ m.



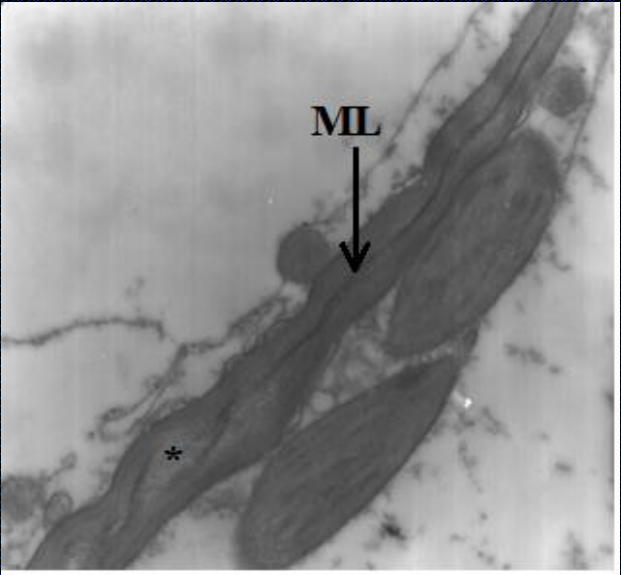
Development of the pedicels of non-treated (A-D) and GA-treated fruits (E-H) as observed under an optical microscope. Exogenous GA was applied to the pedicel at 35 days after full bloom (DAFB). The images show development at 40 (A and E), 60 (B and F), 80 (C and G) and 100 DAFB (D and H).

C, cork layer; Ct, cortex; Ft, fibrous tissue; P, phloem; Pi, pith; X, xylem. (Yosup Park, Hee-Seung Park. 2017. Scientia Horticulturae)

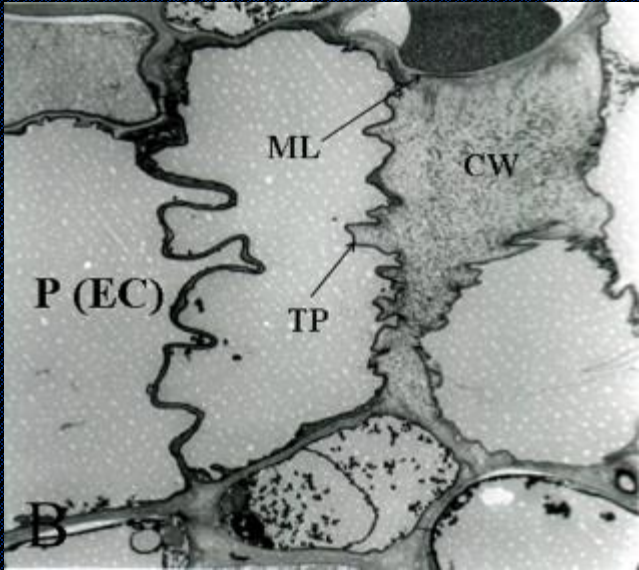
The final size of the pedicels did not differ between treatments, but the GA-treated pedicels attained their final size 20 days earlier than the non-treated pedicels due to the accelerated enlargement of the GA-treated pedicels shortly after treatment. The increased size of the GA-treated fruits appeared to be dependent on increased cell expansion, whereas the accelerated pedicel development appeared to be dependent on increased rates of cell division. In particular, the increase in the diameter of the GA- treated pedicels was primarily due to improvements in the sizes of xylem and phloem tissues as a result of acceleration of cell division. In addition, the effect of exogenous GA on the acceleration of pedicel development was concentrated at the initial stage of active cell division, and during this period, the sizes began to differ between the GA-treated and non-treated fruits.



Merlot 포도 과실의 과피와 과육의 경계 (박희승)



청도반시 단감에 에틸렌발생제 처리 7일후 세포벽 분해 (박서준, 박희승, 김종천)



신고 배의 탈코르크 과정에서의 코르크형성층 세포의 세포벽 분해 (홍윤표, 이승구, 박윤문, 박희승)

- 과수 각 기관의 세포분열, 세포비대 및 조직분화 등 기본적인 구조에 대한 연구는 과수 재배시 시기별로 발생하는 여러가지 현상에 대한 이해를 가능하게 함
- 수확전·후의 다양한 환경에서 발생하는 생리장해의 원인 구명과 피해 경감 기술을 개발하는데 활용도가 매우 높음
- 과수 재배시 이용되는 각종 처리에 대한 식물체의 반응을 직관적으로 구명할 수 있음
- 신품종 육성시 과수의 해부학적 특성 파악은 재배상에서 나타나는 다양한 현상을 예측 가능하게 해줌
- 따라서 현미경을 이용한 연구는 모든 식물의 구조와 기능을 파악하기 위한 연구에 활용될 수 있는 것과 마찬가지로 과수 연구에서도 다양한 분야에 활용할 수 있음
- 반면에 과수는 원예 연구의 한 분야로써 응용과학의 특성상 해부학적 연구만으로 모든 문제를 해결하기에는 한계가 있을 수 있으며 현장 연구나 대사 생리를 포함한 다양한 연구와 접목될 때 상승효과를 낼 수 있음

**Thank you**