

콩 종皮的 形態的 特性과 糊粉層 細胞의 酵素活性 研究

朴政和* · 金容旭*

Morphological Characteristics of Seed Coat and Enzyme Activity of Aleurone Layers in Soybeans

Jeong Hwa Park* and Yong Wook Kim*

ABSTRACT

Soybean seed coat consisted of three layers, and the aleurone layer was attached to the innermost part of seed coat. It showed the different morphological characteristics with single cell layer compared with many cell layers in barley aleurone layer. The structural difference in aleurone cell among varieties was not detected in this experiment. The hole of middle part of hilum consisted of net formed material in order to pass water and gas. In the experiment, it was not studied whether the varieties with hard seed consist of the same structure or not, but the detailed study on this would be necessary. The activity of acid phosphatase showed a tendency to increase in process of imbibition in distilled water. There was no significant difference in the enzyme activity among the varieties tested, but the enzyme activity of Danyoupkong was slightly higher than that of Hwanggeumkong. In germinability, Danyoupkong is higher than Hwanggeumkong, so it might be attributed to the higher activity.

There was no difference in acid phosphatase activity between released from the aleurone cell and accumulated in the aleurone cell from 6 to 12 hours incubation of the medium in the absence of GA₃, but the difference was detected after 12 hours incubation. And enzyme activity was the highest in the 18 hours incubation. The increase in the release of acid phosphatase from the aleurone cell would be considered as passive diffusive effect due to the increase in turgor pressure of aleurone cell. The acid phosphatase released from aleurone layer increased greatly after 24 hours incubation of the medium in the presence of GA₃, and the accumulation within the aleurone cell decreased linearly after 18 hours incubation. The result indicates that GA₃ enhance the rate of enzyme release from aleurone layer, suggests that the aleurone cell wall be digested by the introduction of GA and the digested wall act as the channels for enzyme release.

緒 言

식물의 種子는 發芽時 水分을 흡수하여 각종 酵素가 活性化되므로 貯藏養分이 분해되고 분해된 養分の 이용으로 細胞內的 새로운 물질생산과 함께 계속적인 發育이 지속된다. 種子的 발아시 胚乳內 저

장물질의 분해에 관한 연구는 19세기말 양조산업의 발달과 더불어 麥酒의 원료인 보리(*Hordeum vulgare*)를 재료로 많이 수행되어 온 결과 발아초기 胚에서 생성된 Gibberellin 이 胚盤과 胚乳를 지나 糊粉層으로 이동하여 α -amylase 를 포함한 여러 가수분해효소의 합성을 促進시키고 이 酵素들은 糊粉層細胞로부터 胚乳로 배출되어 저장물질의 分解를

*東國大學校 農科大學(Dept. of Agronomy, Dong Guk university, Seoul 100-715, Korea) <88. 3. 17 接受>

촉매한다고 밝혀졌다.^{3,4,6,12,15)}

또한 糊粉層細胞로부터의 酵素排出經路에 관한 세포생화학적 研究結果에 의하면 호분층의 水分吸收만으로는 酵素가 糊粉層細胞 밖으로 충분히 빠져 나오지 못하고 주로 세포막 안쪽에 蓄積되나 Gibberellin의 작용에 의하여 호분층 細胞膜의 분해가 촉진되므로 酵素의 배출이 促進·增加된다고 報告되었다.^{1,16)} 이러한 가수분해 酵素들의 배출경로에 대한 細胞生化學的 관찰은 주로 Acid phosphatase를 표준으로 하여 연구되어 왔다. 그러나 이와같은 내용의 연구가 주로 보리나 밀(*Triticum aestivum*)과 같은 화본과 작물의 種子를 材料로 많은 진전이 있었으나 胚乳가 없고 貯藏機關이 자엽인 콩(*Glycine max*)과 같은 두과작물에 대해서는 연구가 미흡한 상태이다.

따라서 본 연구는 光學顯微鏡과 電子顯微鏡을 이용하여 콩 종피세포의 構造的 특성과 Acid phosphatase를 표준으로 하여 加水分解酵素의 活性經路에 관한 세포생화학적 관찰과 함께 Acid phosphatase의 활성화변화, 생성 및 배출작용과 Gibberellin과의 관계를 규명하여 콩의 發芽力 향상과 發芽力이 높은 우량품종 선발의 기초적 資料를 얻고자 수행되었다. 끝으로 본 연구의 수행을 위한 文教部學術振興財團의 지원에 깊은 感謝를 표하는 바이다.

연구 史

콩의 種皮는 胚珠의 외주피에서 발육된 3개의 층으로 구성되어 있는데 최외층은 大保強細胞(Macrosclereid)로 형성된 층으로 柵狀層이며 Esau⁷⁾에 의하면 種皮의 최초 보호조직으로서 기체와 水分의 이동을 제어하는 역할을 한다고 하였다. 柵狀層 아래 두번째 층은 細胞間隙이 큰 骨狀保強細胞(Osteosclereid)로 형성되어 있고 骨狀保強細胞의 特徵的 형태로 인하여 長鼓狀層으로 일컬어지며, Carlson⁸⁾은 이 장고상층의 역할이 柵狀層을 지지하는 것이라고 보고하였다. 長鼓狀層 밑에는 柔組織層이 위치하는데 Thorne¹⁴⁾은 미성숙된 種皮에 있어서 被同化物質이 柔組織內的 脈管을 통해 발육중인 胚珠로 이동하고 柔組織 밑에는 세포질을 지닌 立方形의 糊粉細胞가 붙어 있다고 하였다.

胚乳內 貯藏物質의 분해에 관해 1890년 Brown과 Morris는 보리에 있어서 胚乳細胞膜의 分解와

저장전분의 加水分解는 胚盤 근처에서부터 시작되어 胚乳의 바깥쪽을 따라 진행되며 胚를 제거하면 분해가 극히 늦어지거나 방해된다고 하였고 Haberlandt는 糊粉層에서 이동성의 酵素가 生成됨을 밝혀냈으나 배와 호분층의 酵素가 胚乳의 분해와 관련이 있음을 명확히 究明하지는 못했다. 1960년 Paleg¹²⁾는 胚를 제거시킨 보리종자를 배와 함께 培養實驗한 결과 더욱 많은 α -amylase가 생성됨을 밝혀냄으로써 胚로부터 酵素의 생성을 촉진시키는 물질이 확실됨을 증명하였다. 그후 계속된 연구결과 Briggs⁴⁾는 이 물질이 Gibberellin임을 밝혀내고 發芽初期 胚에서 분비된 Gibberellin이 糊粉細胞로 이동하여 α -amylase를 포함한 加水分解酵素의 合成을 촉진시키고 酵素는 胚乳로 배출되어 貯藏物質의 분해를 촉매, 胚로 확산될 수 있는 물질로 만들고 胚는 이를 영양원으로 하여 成長한다고 결론지었다. 또한 Briggs⁴⁾는 胚에서 많이 생성되는 Gibberellin은 GA₁과 GA₃이며 그의 GA₄, GA₇도 발견되며 GA₃와 GA₇은 糊粉細胞에 작용하고 GA₁과 GA₄는 胚의 성장에 관여한다고 하였다. 1967년 Filmer와 Varner¹⁰⁾은 H₂¹⁸O에 GA를 添加한 용액에 보리의 糊粉層을 培養實驗한 결과 糊粉層細胞內의 단백질이 分解되어 Amino Acid가 만들어지고 이 아미노산에 의해 α -amylase가 생성된다고 보고하였다. 지금까지 GA의 영향으로 糊粉細胞에서 生成, 排出되는 酵素로는 α -amylase 외에 proteinase, pentosanase, limit dextrinase, α -glucosidase 등이 알려져 있고 ribonuclease, β -1, 3-glucanase, phosphatase는 GA에 의해 糊粉細胞에서 분비는 되지만 生成과는 직접적인 관련이 없다고 보고되고 있다.

상기한 바와 같이 GA에 대한 生理反應에 관해서는 많이 究明되어 왔으나 糊粉細胞에서 胚乳로의 酵素排出 작용에 관해서는 잘 알지 못했으나 1972년 Varner와 Mense¹⁶⁾에 의해 酵素排出의 두 경로가 제안되었다. 즉 원형질막을 통한 糊粉細胞 밖으로의 능동적 분비와 확산작용에 의한 細胞膜의 통과에 의하여 糊粉層 밖으로 酵素가 배출된다고 하였다. 이에 대하여 Ashford와 Jacobsen¹⁾은 세포막이 加水分解되지 않는다면 확산작용에 의한 酵素排出의 경로는 불가능하다고 주장하고 보리의 분리호분층을 재료로 분리호분층에 GA를 처리하면 細胞膜이 연화, 분해되면서 酵素의 배출이 현저히 증가된다고 하였고, 이들은 GA에 의해 誘導되는 加

水分解酵素 활성의 세포학적 경로를 Acid phosphatase 들 표준으로 하여 관찰, 보고하였다.

材料 및 方法

1. 種皮構造의 特性

콩 種皮의 구조적 특성을 관찰하기 위하여 콩의 種皮를 분리 1.0cm 정도의 크기로 면도칼로 절단하여 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)에 용해시킨 2.5% glutaldehyde 용액에 4°C에서 2시간 고정시킨 다음 같은 농도의 phosphate buffer 에 4°C에서 15분씩 3회 세척한 후 30, 50, 70, 95%의 Acetone에 각각 10분씩 2회, 100% Acetone에 10분씩 3회 탈수시킨 種皮材料를 critical point dryer (Balzer union C.D 010)에서 액화 CO₂로 건조시켰다. 건조후 sputter coater (Edwards 101 B)에서 2분간 금으로 coating 시킨 다음 scanning electron microscope로 관찰하였다.

糊粉細胞의 구조적 특성은 콩 種皮를 1mm³ 정도 절단하여 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2)에 용해시킨 2.5% glutaldehyde 용액에 4°C에서 2시간 전고정시키고 같은 완충용액으로 4°C에서 15분씩 4회 세척한 후 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2)에 용해시킨 1% osmium tetra oxide 용액에 4°C에서 다시 固定시켰다. 고정이 끝난 材料를 같은 濃度の 완충용액에 다시 15분씩 4회 세척시킨 후 30, 50, 70, 90, 95%의 Ethanol에 각각 10분씩 2번, 그리고 100% Ethanol과 propylen oxide에 각각 10분씩 3회 탈수시킨 뒤 propylen oxide/aralditecy 212의 1:1 혼합액에 3시간, 1:2 혼합액에 24시간, 순수 Araldite에 8시간 포매시키고 35°C에서 24시간, 40°C에서 24시간, 70°C에서 48시간 硬化시킨 材料를 ultramicrotome으로 1μm 두께로 절단하여 slide glass 위에 놓고 Azur II로 염색후 광학현미경 (carl zeiss)으로 관찰하였다.

2. 糊粉層酵素 活性的의 細胞學的의 觀察

1.0mm³ 크기의 種皮 절편을 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2)에 용해시킨 2.5% glutaldehyde에 4°C에서 2시간 고정시킨 다음 같은 농도의 완충액으로 15분씩 4번 세척시켰다. 세척이 끝난 후 0.1 M acetate buffer (pH 5.0)

500 ml와 lead nitrate 0.6g과 3% sodium glycerol phosphate 50ml를 혼합한 후 37°C에서 2시간 두었다가 여과지로 여과시킨 Gome-ri Acid Phosphate Stain에 37°C에서 2시간 동안 培養시켰다. 그다음 0.1 M acetate buffer (pH 5.0)와 0.1 M sodium cacodylate buffer에 각각 10분씩 3번 세척한 후 2%의 ammonium sulfide에 10분간 두었다가 같은 농도의 acetate buffer, sodium cacodylate buffer와 증류수에 각각 10분간씩 2회 세척하였다. 세척이 끝난 후 탈수, 포매 및 경화 과정은 糊粉層의 구조특성 실험 방법과 같다. 마찬가지로 標本을 1μm의 두께로 절단하여 slide glass 위에 놓고 光學顯微鏡 (carl zeiss)으로 觀察하였다.

3. 酵素의 活性變化

材料의 준비: 供試品種으로 황금콩과 단엽콩 두品種이 供試되었으며 건전한 均一種子를 선별하여 반으로 절단 배를 제거시킨 후 1.0% NaOCl 용액에 10분간 침지시킨 다음 蒸溜水로 세척하고 蒸溜水와 培養液에 각각 培養시켜 Acid phosphatas의 활성이 測定되었으며 실험은 3反復으로 수행되었다.

蒸溜水 培養: Petri dish에 2점의 여과지 (Whatman No.40)를 깔고 20ml의 증류수를 添加한 다음 胚를 제거시킨 반쪽 種子를 40개 넣고 25°C에서 12, 24, 48시간 培養시킨 뒤 種皮를 분리하여 여과지로 種皮表面의 수분을 除去시키고 0.3g의 種皮를 마쇄주발에 0.01 M acetate buffer (pH 5.0) 5ml와 살균된 모래를 약간 넣고 분쇄시켰다. 분쇄된 試料를 원심분리 tube에 쏟아놓고 7,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후 상등액을 酵素活性分析의 酵素溶液으로 사용하였다.

培養液 培養: 培養液은 GA₃을 添加한 것과 添加하지 않은 處理를 두었는데 GA₃ 무처리 배양액은 2μM acetate buffer (pH 5.0) 1.8 ml와 200μM calcium chloride 0.2 ml를, GA₃ 처리는 같은 농도의 acetate buffer 1.8 ml, 200μM calcium chloride 0.1 ml, 2μM GA₃ 0.1 ml를 각각 50ml 삼각 flask에 넣고, 胚를 제거시킨 반쪽종자를 6시간 증류수에 침지시켜 種皮를 분리한 뒤 表面의 수분을 제거하고 0.3g의 種皮를 각각의 준비된 flask에 pincent로 집어 옮긴 뒤 25°C에서 12, 18, 24, 30시간 배양시켰다. 培養이 끝난 후 培養液은 test tube에 따라 불고 직접 酵素活性分析의

酵素溶液으로 사용되었고 나머지 種皮는 蒸溜水 培養 方法에서와 같은 方法으로 하여 上등액을 分析 하였다.

Acid phosphatase의 活性分析 : 각각의 處理에서 0.2 ml의 酵素溶液을 취하여 시험관에 넣고 기질(10 mg/ml p-nitrophenyl phosphate in 0.01 M acetate buffer pH 7.0) 1 ml을 添加하여 25 °C에서 10 분간 反應시킨 후 0.1 N NaOH 용액 1.0 ml를 添加하여 反應을 中止시키고 4.0 ml의 蒸溜水로 희석한 다음 분광도계(Bausch and Lomb Spectrometer 20)로 410 nm의 파장에서 吸光度가 측정되었고 酵素의 活性은 P-Nitrophenol 標準曲線을 사용하였다. 활성은 10 분간의 反應시간의 성적을 平均의상 그대로 나타내었다.

結果 및 考察

1. 콩 種皮構造의 特性

콩 種皮構造의 特性을 알기 위해 乾燥種子를 절단하여 Scanning Electron Microscope 로 관찰하였다(사진 1, 2). 또한 種子를 48 시간 蒸溜水에 침

지시킨 후 種皮를 분리, 처리하여 光學顯微鏡으로 관찰하였다(사진 3).

콩 種皮構造의 特性은 세로로 길게 對保強細胞가 밀집하여 水分이나 gas 에 대해 불투과성을 보이는 것으로 외부로의 侵入에 대한 抑制作用으로 種子를 보호하고 그 밑에 骨狀保強細胞가 울타리 모양의 지주형태로 대보강세포와 柔組織細胞를 지지하여 외부의 機械的 충격에 대한 完充作用을 하는 것으로 思 料된다(사진 1, 2). 柔組織은 긴 평면 형태의 5~6 층의 세포로 構成되어 있고 제일 밑에 단층의 일렬로 이어진 벽돌모양의 糊粉層이 존재한다. 이것은 보리의 糊粉層이 잘 발달된 圓形의 여러 복합층 細胞로 構成된 것과는 다른 特性이라 할 수 있다(사진 3). 본 實驗에서는 이러한 糊粉層 構造가 품종간에 特性적 차이가 있는지 觀察되지 않았지만 만약 차이가 있다고 한다면 Taiz 와 Jones¹³ 에 의한 糊粉層 원형질연결사(plasmodesmata)가 많다는 報告와 이를 통해 細胞膜內의 分解酵素가 분비된다는 Jones¹⁴ 의 보고를 고찰하여 볼 때 이러한 糊粉層細胞의 발달 정도는 콩 種子의 發芽力 향상을 위한 하나의 생



Photo. 1. Section of dry soybean seed coat (Scanning electron microscope at 350 magnification.

Ms : macrosclereid Os : osteosclereid
P : parenchyma A : aleurone
C : cotyledon

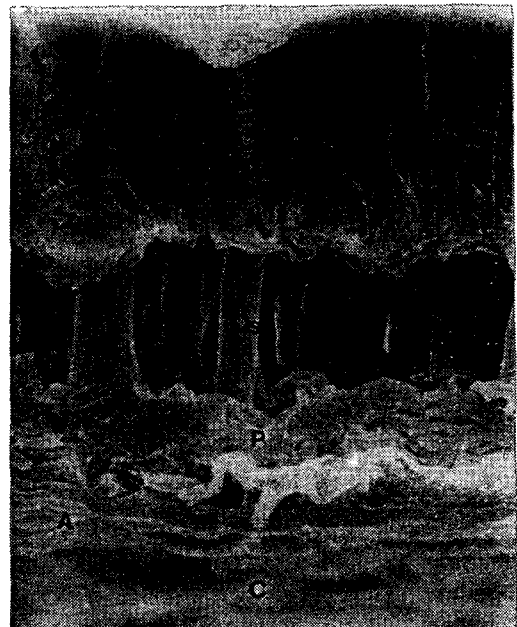


Photo. 2. Section of dry soybean seed coat (Scanning electron microscope at 1,000 magnification).

Ms : macrosclereid Os : osteosclereid
P : parenchyma A : aleurone
C : cotyledon

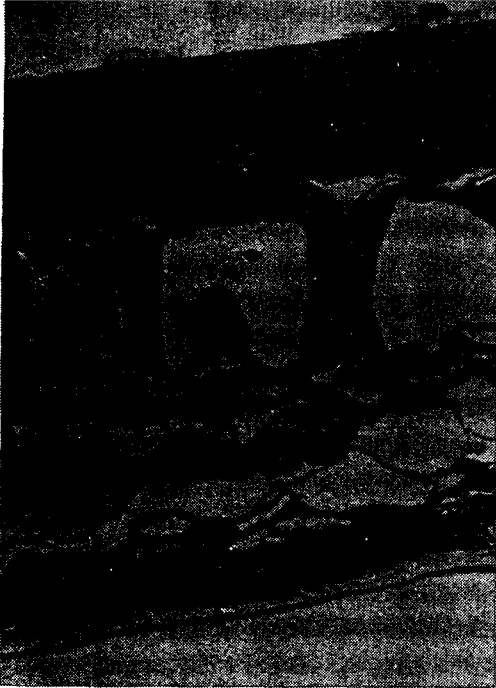


Photo. 3. Section of soybean seed coat imbibed in distilled water for 48 hours (Light microscope at 400 magnification) black arrows show each aleurone cell.

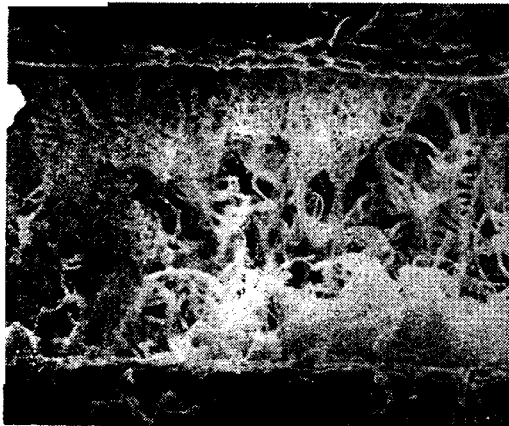


Photo 4. Middle part of soybean hilum showing net-formed material structure (Scanning electron microscope at 700 magnification)

리적 지표가 될 것으로 推測된다. 사진 4는 제(hilum)의 中央部位를 Scanning Electron Microscope로 관찰한 것인데 수분과 gas의 吸收와 排出

이 용이하게 수세미 열매와 같은 망사의 형태를 보이고 있다. 본 實驗에서는 제시되지 못했으나 水分의 吸收가 억제되어 發芽가 힘든 hard seed의 細胞의 구조적 特性이 본 실험의 短葉콩처럼 망사 구조로 되어 있는지 아니면 이와는 다른 構造的 特性을 갖고 있는지 究明하는 것이 必要하다고 思料된다.

2. 酵素活性에 관한 細胞學的 觀察

種子的 發芽過程에서 수분의 吸收와 더불어 種子內的 加水分解酵素가 활성화되어 胚乳의 각종 貯藏物質을 분해, 초기 發芽生長의 영양원으로 이용하게 되는데 이와 같은 加水分解酵素들에 대한 콩 種皮에서의 活性位置 및 活性經路를 細胞學的 측면에서 알아보기 위해 Acid phosphatase를 표준표식 酵素로 하여 光學顯微鏡으로 관찰한 결과는 사진 5, 6, 7, 8, 9와 같다.

사진 5는 乾燥種子種皮의 Acid phosphatase 활성 위치를 관찰한 것인데 糊粉層細胞에 Acid phosphatase의 활성이 微弱하여 진하게 染色되지 않았으며 48시간 蒸溜水에 침지시킨 種皮에서는 糊粉層細胞가 진하게 染色되어 있음을 관찰할 수 있고

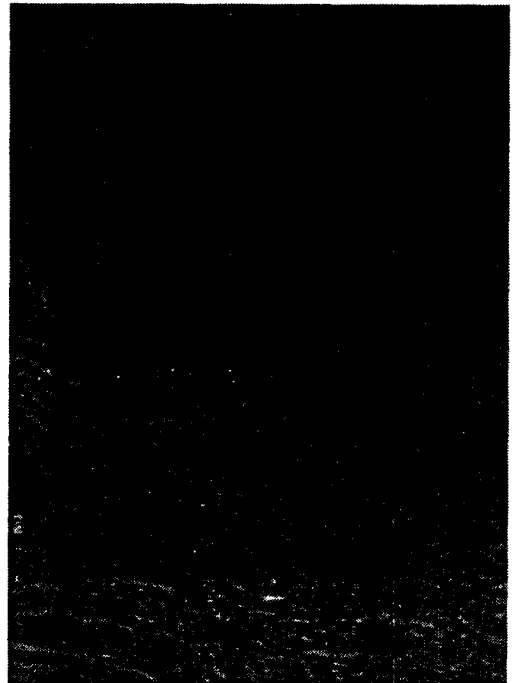


Photo 5. Section of dry soybean seed coat. The aleurone cell. P: parenchyma (Light microscope at 400 magnification)

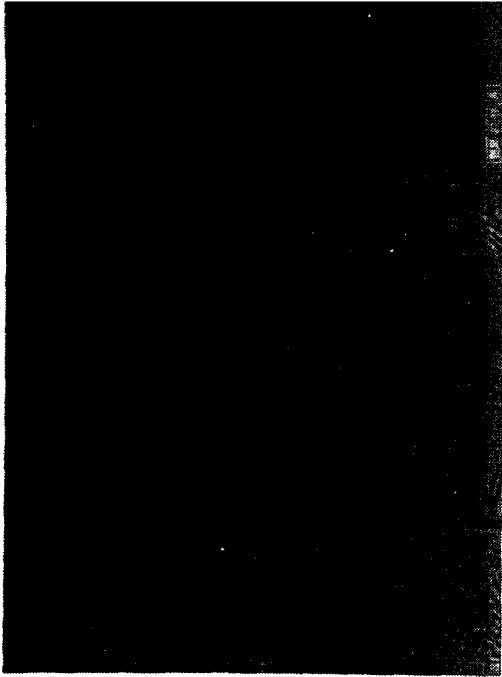


Photo 6. Section of soybean seed coat imbibed in distilled water for 48 hours showing acid phosphatase activity in the aleurone cells. The dark stained region (black arrows) and P show acid phosphatase activity in the aleurone cells and parenchyma cells, respectively (Light microscope at 600 magnification)

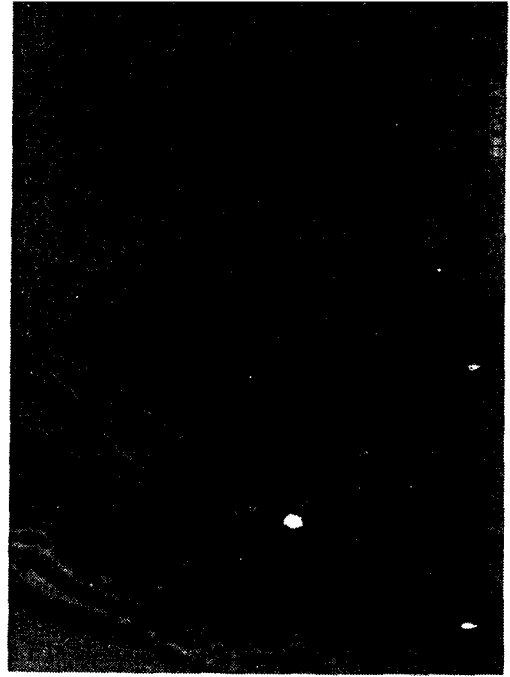


Photo 7. Section of soybean seed coat imbibed in distilled water for 48 hours showing acid phosphatase activity in the aleurone cells. The dark stained region (black arrows) and P show acid phosphatase activity in the aleurone cells and parenchyma cells, respectively (Light microscope at 1000 magnification)

(사진 6, 7) 72 시간 침지 종피에서는 糊粉層細胞 뿐만 아니라 糊粉層細胞 밖으로 배출된 Acid phosphatase 가 柔組織 細胞膜 주변에 산재하여 있음을 볼 수 있다(사진 8, 9). 이와 같이 糊粉層細胞 밖으로부터의 가수분해 酵素들의 배출을 糊粉層細胞의 팽압의 증가와 또는 人爲的 자극에 의한 破壞로 起因된 것으로 思料된다.

표 1 은 胚를 제거한 반쪽 콩 種子를 蒸溜水에 12, 24, 48 시간 침지시킨 후 種皮를 분리하여 25 °C에서 10분간 반응시킨 뒤 Acid phosphatase 의 활성을 측정 한 것인데 침지시간이 경과함에 따라 황금콩이나 단엽콩 모두 酵素의 활성이 증가하는 경향이였다. 이 結果는 酵素活性 위치의 細胞學的 관찰결과를 뒷받침해 주고 있으며 위의 結果를 종합해 보면 콩 種皮內의 가수분해 효소는 糊粉層細胞內에서 生成되고 水分吸收後 시간이 경과함에 따라 活

Table 1. Changes in acid-phosphatase activity in aleurone layer of deembryonated half grain at different imbibition time

Imbibition hours	Acid phosphatase (mol · 0.3g ⁻¹ · 10min ⁻¹)	
	Hwanggeumkong	Danyoupkong
12	0.302	0.358 ± 0.002
24	0.359 ± 0.001	0.359 ± 0.005
48	0.396 ± 0.008	0.413

性化가 증가되고 이러한 加水分解酵素는 GA 의 직접적인 영향을 받지 않고도 糊粉層 밖으로 배출된다고 생각된다. 이는 Ashford 와 Jacobsen¹⁾ 이 보리를 가지고 試驗한 結果와 일치하며 Bennett와 Chrispeels 는 보리에 있어서 ribonuclease 와 β-1, 3-gluconase 가 GA 처리 없이도 活性이 증

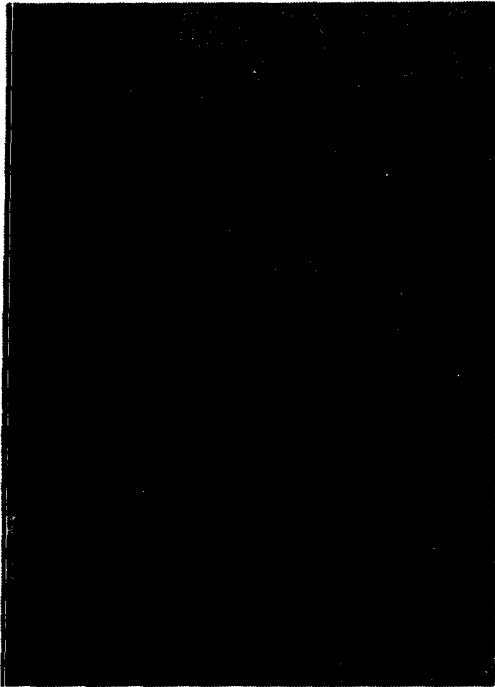


Photo 8. Section of soybean seed coat imbibed in distilled water for 72 hours showing increase in the intensity of acid phosphatase activity in the aleurone cell walls and increase in the release of acid phosphatase from the aleurone cells into the parenchyma cells. Compared the photo 6. The dark stained region (black arrows) show acid phosphatase activity in the aleurone cell walls and parenchyma cell walls, respectively P : parenchyma. A : aleurone (Light microscope at 600 magnification)

가 된다고 보고한 바 있다. Acid phosphatase의 활성이 품종간 통계적으로 유의성은 없었으나 황금콩이 短葉콩보다 다소 낮게 나타나는데 이는 發芽力에 있어서 황금콩이 단葉콩보다 낮은 원인이 되지 않나 추측된다.

3. 酵素의 排出

그림 1과 2는 黃金콩과 短葉콩의 胚를 제거한 반중자를 6시간 蒸溜水에 침지시킨 후 種皮를 분리하여 GA_3 과 添加되지 않은 培養液에 $25^{\circ}C$ 에서 6시간 간격으로 30시간에서 糊粉層細胞 밖으로 빠

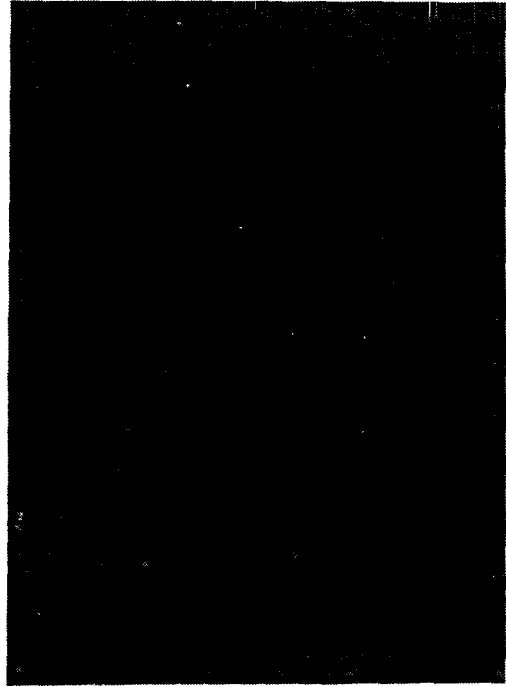


Photo 9. Section of soybean seed coat imbibed in distilled water for 72 hours showing increase in the intensity of acid phosphatase activity in the aleurone cell walls and increase in the release of acid phosphatase from the aleurone cells into the parenchyma cells. The dark stained region of large black arrows and small black arrows show acid phosphatase activity in the aleurone cell walls and and in the parenchyma cell walls. (Light microscope at 1000 magnification)

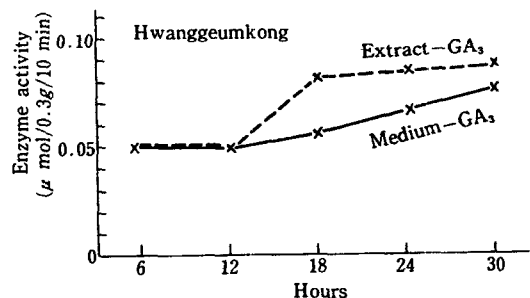


Fig. 1. Changes in acid-phosphatase activity in bathing medium and in isolated aleurone layers incubated in the absence of GA_3 . The layers were isolated from 6-h-imbibed half-grains.

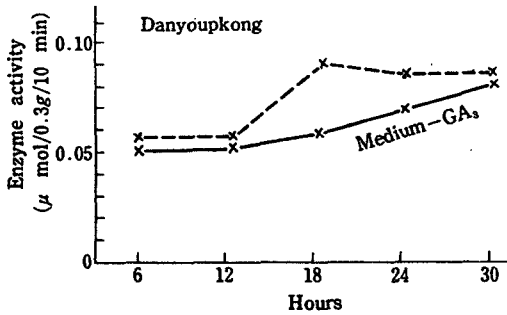


Fig. 2. Changes in acid-phosphatase activity in bathing medium and in isolated aleurone layers incubated in the absence of GA₃. The layers were isolated from 6-h-imbibed half-grains.

저나와 배양액으로 배출된 Acid phosphatase와 호분층 세포내에 축적되어 있는 Acid phosphatase의 활성을 비교한 결과인데 6시간부터 12시간까지는 거의 차이가 없었으나 18시간 이후부터는糊粉層細胞内に 축적되어 있는 酵素의 활성량이細胞 밖으로 배출된 것보다 다소 높은 경향이었고, 또한 배출된 양도 배양시간이 경과함에 따라 점차적으로 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 콩種皮의糊粉層細胞에서 Acid phosphatase와 같은加水分解酵素가 GA의 직접적인 영향을 받지 않고도 다소糊粉層細胞 밖으로 배출되며糊粉層細胞에서活性化된 효소는培養初期에는 세포막을 뚫고 나오지 못하고 있다가 水分的 吸收과 더불어 팽압이 점차 증가함으로써 수동적 확산작용때문에 배출이 나타난다고 思料된다. 糊粉層細胞内に 축적되어 있는加水分解酵素들이 糊粉層細胞膜을 쉽게 빠져 나오지 못하는 이

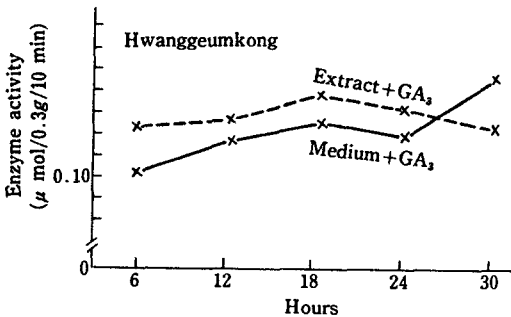


Fig. 3. Changes in acid-phosphatase activity in bathing medium and in isolated aleurone layers incubated in the presence of 2 μM GA₃. The layers were isolated from 6-h-imbibed half-grains.

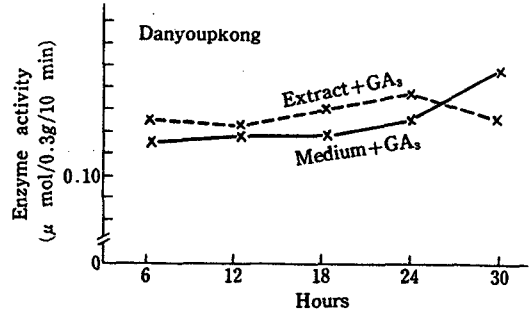


Fig. 4. Changes in acid-phosphatase activity in bathing medium and in isolated aleurone layers incubated in the presence of 2 μM GA₃. The layers were isolated from 6-h-imbibed half-grains.

유는 Fulcher⁹⁾ 등은 세포막 안쪽부분과 바깥쪽부분의 화학적 조성이 다르기 때문이라 하였고 Ashford와 Jacobsen¹⁰⁾은 酵素가 糊粉層細胞膜 안쪽부분에서 선택적으로 결합을 하고 바깥부분이 酵素에 대하여 불투과성을 지니고 있기 때문이라고 하였다.

그림 3과 4는 GA₃을 添加한 培養液에 앞에서와 같은 방법으로 黃金콩과 短葉콩의 種皮를 분리 배양시킨 후 Acid phosphatase의 活性變化를 測定한 결과인데 黃金콩과 短葉콩 모두 24시간까지는 糊粉層細胞 밖으로 배출된 酵素의 활성량과 糊粉層細胞内に 축적되어 있는 것과는 차이가 없었으나 24시간 이후부터는 排出된 酵素의 활성량이 급격히 增加되고 반면에 糊粉層細胞内に 남아있는 酵素의 양은 급격히 減少하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 GA₃을 처리하지 않은 실험결과인 그림 1과 2를 비교하여 볼 때 GA₃가 糊粉層細胞로부터의加水分解酵素의 배출작용을 크게 增加시키는 직접적인 영향을 미치는 것으로 思料된다. Taiz와 Jones¹³⁾은 糊粉層細胞膜에는 원형질 연결사가 많아 이 주위에서 GA는 세포막을 分解하여 酵素排出의 통로를 용이토록 하며 糊粉層細胞内에서 Acid phosphatase의 생성은 GA에 의해 크게 支配를 받지 않고 배출에는 크게 직접적인 影響을 한다고 報告하였다. 본 실험에서 GA₃을 添加하지 않은 處理와 添加한 處理를 비교하여 보면 GA₃를 처리한 培養液에서 Acid phosphatase의 活性이 다소 높은 것으로 보아 아마도 GA가 초기 種皮의 糊粉層細胞에서加水分解酵素의 생성에도 영향을 하는 것으로 推測되므로 앞으로 이 분야에 대해서는 보다 주의깊은 實

驗觀察이 요구된다.

는 역할을 하는 것으로 추정된다.

摘 要

콩種皮의 構造的 特性을 電子顯微鏡과 光學顯微鏡으로 자기 관찰하였고 發芽初期 水分吸收 段階에서 加水分解酵素의 활성, 배출 경로와 이에 대한 GA_3 의 생리적 영향을 究明하고자 본 실험이 遂行되었으며 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 콩種皮는 크게 세 층으로 구성되어 있으며 제일 안쪽에 糊粉層細胞가 1 열로 배열되어 있는 것은 보리에서와 같이 여러 층의 복합층으로 구성되어 있는 것과는 다른 構造的 特性을 보였고 이러한 특성이 品種間에 차이가 있는지에 대해서는 본 實驗에서는 관찰되지 않았다.

2. 콩種皮의 일부인 제의 中央部位는 水分 및 कै스의 吸收와 배출이 용이하도록 많은 망사로 구성되어 있었으며 이러한 구조적 特性이 hard seed에 대해서는 어떠한가에 대해 본 實驗에서는 究明되지 못했으나 앞으로 이 분야에 대해서 보다 進진된 研究가 必要하다고 思料된다.

3. 콩種皮를 蒸溜水에 침지하여 Acid phosphatase의 활성변화를 측정 한 결과 침지시간이 경과함에 따라 酵素活性이 증가하는 경향을 보였고 이러한 활성의 차이가 품종간에는 有意性이 없었지만 단엽콩이 황금콩보다 다소 높은 경향이였다. 실제로 短葉콩이 黃金콩보다 發芽力이 높은 원인이 이러한 加水分解 酵素의 활성차이에 있지 않을까 추정된다.

4. GA_3 를 添加하지 않은 培養處理에서 Acid phosphatase의 활성은 6시간부터 12시간까지는 糊粉細胞 밖으로 배출된 것과 糊粉細胞內에 남아 있는 것과는 거의 차이가 없이 같았으나 12시간 이후부터 차이가 나타났고 18시간 培養處理에서 가장 酵素의 활성이 높았다. 또한 배출된 酵素의 활성양이 점차적으로 증가한 것은 糊粉層細胞의 팽압이 증가함으로써 수동적 확산작용때문인 것으로 思料된다.

5. GA_3 를 添加한 배양처리에서 Acid phosphatase는 24시간 이후부터 糊粉層細胞 밖으로 크게 배출되어 나왔고 반면 18시간 이후부터 糊粉層細胞內에 축적되어 있는 Acid phosphatase는 점차적으로 減少하였다. 이러한 結果는 초기 콩種子の 發芽段階에서 GA_3 의 역할은 種皮의 糊粉細胞膜을 분해시켜 酵素가 세포막을 뚫고 배출이 容易하게 하

引用 文 獻

1. Ashford, A.E., and J.V. Jacobson. 1974. Cytochemical localization of phosphatase in barley aleurone cells: The pathway of gibberellic acid-induced enzyme release. *Planta*. 120: 81-105.
2. Bennett, P.A., and M.J. Chrispeels. 1972. De novo synthesis of ribonuclease and β -1, 3-glucanase by aleurone cells of barley. *Plant Physiol.* 49: 455-447.
3. Bewley, J.D., and M. Black. 1978. Physiology and biochemistry of seeds: in relation to germination. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York, 2: 177-281.
4. Briggs, D.E. 1968. α -amylase in germinating, decorticated barley - I, II, III. *Phytochem.* 7: 513-554.
5. Carlson, J.B. 1973. Morphology: in Soybeans. Cardwell BE. Madison, WI, 17-18.
6. Chrispeels, M.J., and J.E. Varner, 1967. Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of α -amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 42: 398-406.
7. Esau, K. 1977. Anatomy of seed plants. John Wiley and Sons. New York, 463-466.
8. Filmer, P., and J.E. Varner. 1967. A simple and unequivocal test for de novo synthesis of enzymes; density labelling of berley α -amylase with $H_2^{18}O$. *Proc. Natl. Acaol. Sci. U.S.A.* 58: 1520-1526.
9. Fulcher, R.G., T.P. O'Brien and J.W. Lee, 1972. Studies on the aleurone layer. I. Conventional and fluorescence microscopy of the cell wall with emphasis on phenol-carbohydrate complexes in wheat. *Aust. J. Biol. Sci.* 25: 23-34.
10. Jacobsen, J.A., and J.E. Varner, 1967. Gibberellic acid-induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* 42: 1596-1600.

11. Jones, R.L. 1972. Fractionation of enzymes of the barley aleurone layer: Evidence for a soluble mode of enzyme release. *Planta (Berl)*, 103: 95-109.
12. Paleg, L.G. 1960. Physiological effects of gibberellic acid. II. On starch hydrolyzing of barley endosperm. *Plant Physiol.* 35: 902-906.
13. Taiz, L., and R.L. Jones. 1973. Plasmodesmata and an associated cell wall component in barley aleurone tissue. *Amer. J. Bot.* 60: 67-75.
14. Thorne, J.H. 1981. Morphology and ultrastructure of maternal seed tissues of soybeans in relation to the import of photosynthate. *Plant Physiol.* 67: 1016-1025.
15. Varner, J.E. 1964. Gibberellic acid controlled synthesis of α -amylase in barley endosperm. *Plant Physiol.* 39: 413-415.
16. _____, R.M. Mense. 1972. Characteristics of the process of enzyme release from secretory plant cells. *Plant Physiol.* 49: 187-189.