

## 리기다소나무의 잎 抽出液이 根端細胞의 形態變化에 미치는 影響

金 溶 玉 · 李 浩 俊\* · 金 恩 洙 · 趙 暎 東<sup>1</sup>

建國大學校 理科大學 生物學科, <sup>1</sup>延世大學校 理科大學 生化學科

리기다소나무 추출액을 농도별로 무와 차풀에 처리한 3일 후에 광학현미경을 이용하여 근단세포를 관찰할 경우 6% 처리구에서는 피층세포가 신장되었으나, 25%, 75% 처리구에서는 오히려 세포 표면이 위축되어 불규칙하게 변화됨으로써 표면부 전체가 심한 굴곡현상을 나타내었다. 특히 차풀에 있어서 75% 처리구의 표피층은 작고 불규칙한 세포들로 상당히 비후되어 있었다. 투과전자현미경으로 근단의 세포를 관찰한 결과 무의 처리구는 대조구에 비하여 표피세포의 원형질막 함입현상이 활발하였고 세포벽은 전자밀도가 높은 과립들이 총상으로 분포해 있었다. 피층세포와 중심주의 유세포에서는 중앙 액포가 발달하였고 지질과립이 감소하였으며 전분형성체가 자주 관찰되었다. 차풀의 처리구는 대조구에 비하여 세포질의 퇴행현상이 심화되었고 일부 잔존한 세포질내에는 중앙 액포가 발달하였는데 그 액포막의 안쪽에는 높은 전자밀도의 물질이 축적되었으며 피층세포와 중심주의 유세포에서는 전분형성체가 뚜렷이 존재하였다.

주요어: 리기다소나무, 타감작용, 근단, 잎 추출액

Allelopathy 현상을 일으키는 allelochemical들은 식물체의 기본대사 과정 이외의 2차 대사산물로서 수용성 또는 휘발성의 형태로 자연에 방출된다(Whittaker and Feeny, 1971). 이것은 대부분 페놀 화합물로서 식물종내 또는 종간의 생화학 반응을 증대하는 물질이며(Rice, 1984) 종자의 발아와 유근생장, 광합성, 세포분열 등에 영향을 미친다(Kapuska and Rice, 1976; Bhowmik and Doll, 1984). 여러 식물의 페놀 화합물이 발아 과정에 처리되었을 경우 추출액의 농도, 처리시간에 따라 근단에 있어서 세포분열의 억제 정도가 달라짐으로써 각 조직의 형태적인 변화가 일어난다(Lorber and Muller, 1976). 특히 이들 중 coumaric acid와 parasorbic acid는 근단 분열조직의 유사분열 과정을 방해함으로써 유근의 생장을 억제시키며, cinnamic acid는 완두의 근단세포 수를 감소시킨다(Cornman, 1946; Jensen and Welbourne, 1962). 또한 allelopathy 현상을 일으키는 *Populus balsamifera*의 잎 추출액이 오리나무의 뿌리생장, 특히 뿌리털의 발달을 억제하여 분열조직을 피사시킨다고 하였다(Jobidon and Thibault, 1981). 이러한 근단의 형태적인 변화 외에 Levitt 등(1984)은 thornapple에서 추출한 알카로이드가 *Helianthus annuus*의 근단세포에서 미소체의 수와 크기를 증가시키고 amyloplast를 축적시킨다고 하는 세포 소기관의 변화를 보고하였다. 그러나 이와 같은 연구보고는 일반적으로 coumaric acid와 cinnamic acid 등의 단순 페놀

화합물 처리에 의한 것으로 광합성, 세포분열, 유근생장 억제 등 식물의 생리적인 변화에 대한 외부 유독물질의 억제현상에 대하여 발표된 것이고 생태적인 면에서 온도, 광 조건 등 기후변화와 환경의 복합적인 자연상태의 수용성 물질을 처리한 allelopathy 현상과 관계된 식물 근단조직의 구조 변화, 즉 세포신장, 표피, 피층의 피사와 표피화현상, 추출액 농도상승에 따른 조직 및 세포내 소기관의 변화 등에 미치는 영향에 대하여는 보고되지 않았다. 따라서 본 실험은 야외에서 채취한 리기다소나무의 잎 추출액을 농도별로 무와 차풀에 처리함으로써 나타나는 다양한 근단조직의 형태적 변화를 광학 현미경과 투과전자현미경을 이용하여 밝히고자 시도되었다.

### 재료 및 방법

#### 수용액 추출 및 발아실험

수용액 추출은 리기다소나무 잎 200 g에 증류수 1000 mL을 넣어 80°C에서 48시간 동안 진탕시켜 추출한 다음, 15,000 rpm에서 30분간 원심분리(Centrifuge T.-1045, Kontron)한 후 상층액을 실험재료로서 사용하였다. 위에서 진탕 추출한 용액을 100% extract로 하고 추출액의 처리농도는 6%, 12%, 25% 그리고 75%(v/v)로 하였다. 발아실험에 사용된 종자는 예비실험 결과 가장 억제효과가 큰 무와 발아초기에 낮은 농도에서 생장이 촉진된 차풀을 선택하였으며 두 종자를 각기 petri-dish

\*교신저자: Fax (02) 456-8360  
© 한국식물학회 [서울] 1995

(직경 90 mm)당 50립씩을 파종하여 28°C incubator에서 3일간 발아시킨 후 sampling하였다.

**광학현미경 관찰**

리기다소나무 추출액이 농도별로 처리된 무와 차풀의 3일 후의 유식물에서 뿌리 끝을 5 mm 채취하여 Carnoy액으로 24시간 동안 고정시켰다. 이를 ethanol로 탈수시키고 paraffin (mp. 56-58°C)으로 포매하여 뿌리 끝부터 6 µm 두께로 잘라 safranin O와 Harris' haematoxylin으로 염색한 후 대조구와 비교하여 광학현미경으로 관찰하였다.

**전자현미경 관찰**

무와 차풀의 뿌리 끝을 해부 현미경하에서 0.1-0.2 mm 크기로 절단하여 4% glutaraldehyde로 2시간 전고정시킨 후 0.05 M phosphate buffer(pH 7.2)로 수차례 세척하고 2% osmium tetroxide에 1.5시간 후고정시킨 다음 증류수로 5-6회 수세하였다. 고정이 끝난 재료는 ethanol-acetone 탈수과정을 거쳐 Spurr 혼합액(Spurr, 1969)에 포매한 뒤 60°C 항온기에서 24시간 polymerization시켰다. 재료의 절단은 LKV-V ultramicrotome에서 1 µm로 semisection한 후 은색절편을 200 mesh copper grid에 수집하고 1% uranyl acetate에서 20분, 1% lead citrate에서 10분간씩 각각 전자염색하여(Reynolds, 1963) JEM-100CX 투과전자현미경(80 kV)으로 관찰하였다.

**결 과**

리기다소나무의 잎 추출액을 무와 차풀 종자에 처리하여 발아실험을 하였을 경우 각 유식물 성장에서 자엽, 하배축보다는 뿌리 부위의 근단세포에 많은 영향을 미치며 파종한 후 3일된 대조구의 뿌리 길이는 평균 50 mm이고, 추출액의 처리구는 30 mm이며 차풀은 음성 굴중성 현상이 나타났다(Figs. 1, 2). 추출액의 농도를 6%, 25%, 75%로 조절한 다음 두 종자에 처리하여 광학현미경으로 관찰한 결과, 무의 대조구 표피는 규칙적인 구형의 세포들로서 배열되었는데, 처리구의 추출액 농도가 증가하면서 비복 표피와 피층의 세포 수와 크기에는 큰 변화가 없으나 표면부의 불규칙적인 함입으로 인해 심한 굴곡현상이 나타났다(Fig. 3). 차풀의 대조구는 대체적으로 구형에 가까웠으나 처리구의 표피, 피층, 유관속 부위는 심한 수축과 불규칙한 배열을 나타냈다(Fig. 4). 또한 6% 농도에서 피층의 세포가 대조구에 비하여 커졌고(Fig. 4B) 75% 농도에서는 표피층이 두터워지는 현상을 나타냈다(Fig. 4D). 투과전자현미경으로 무의 근단세포를 관찰하면 대조구의 표피세포는

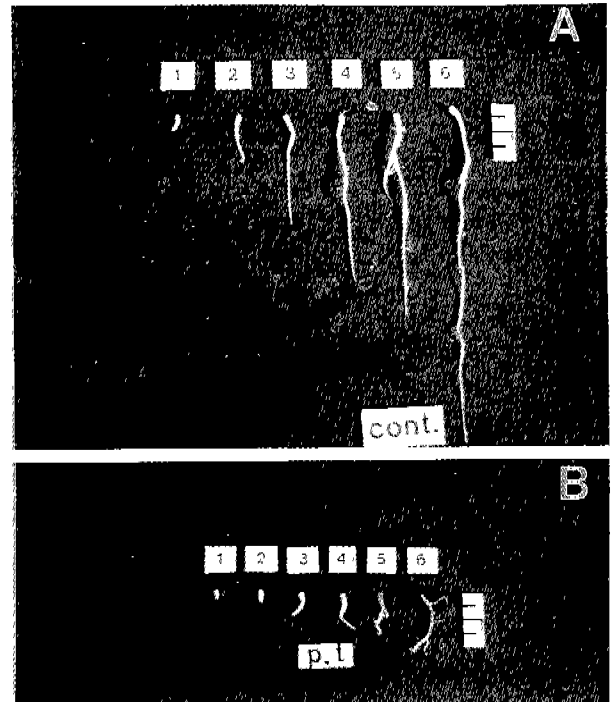


Fig. 1. Effect of *P. rigida* extract of control (A) and treatment (B) on the radicle growth of *R. sativus* var. *hortensis* for acanthiformis during 1-6 days of germination. p.t.: treatment of *P. rigida* extract.

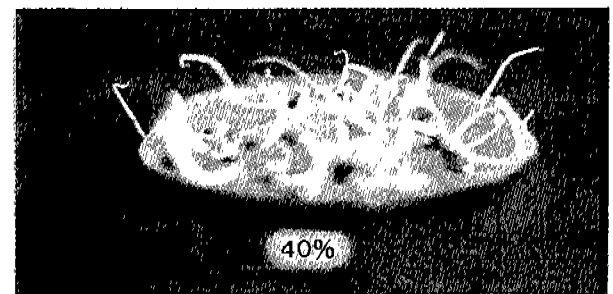
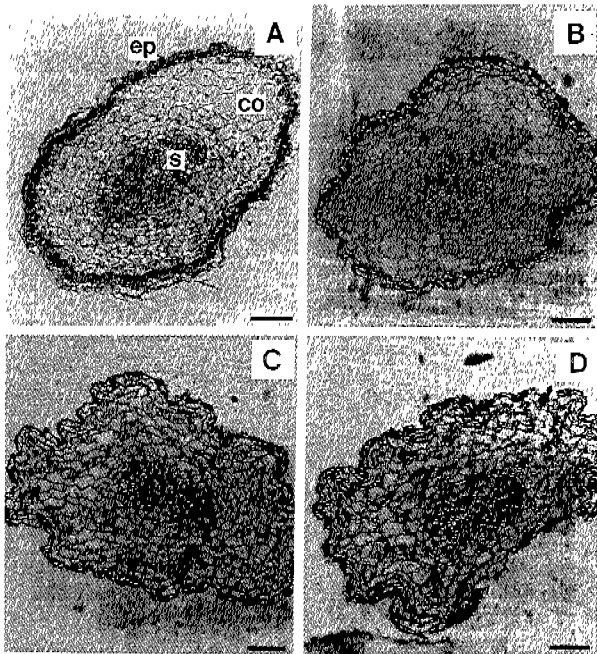
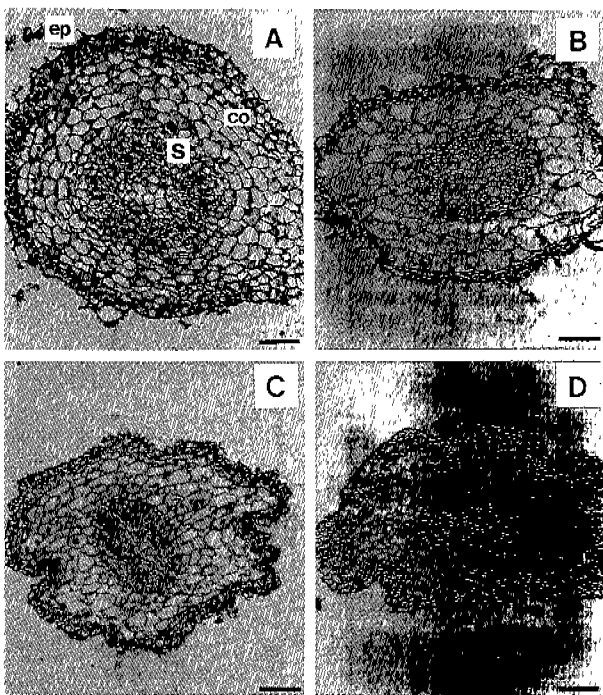


Fig. 2. Negageotropism of radicles of *C. mimosoides* var. *nomame* on 40% extract of *P. rigida*.

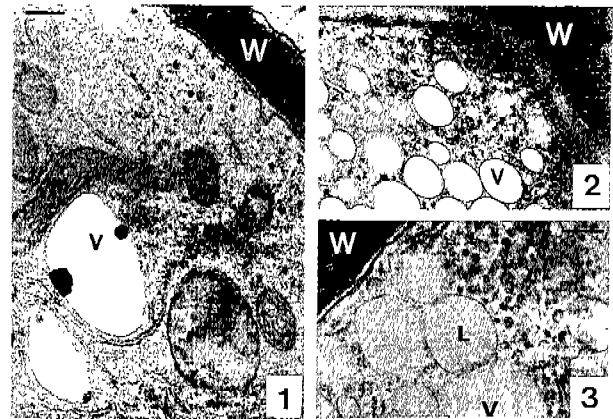
미토콘드리아, 조면소포체, 원시색소체, 액포 등이 주로 관찰되었는데, 액포내에는 전자밀도가 매우 높은 물질이 액포막에 인접하여 존재하였다(Fig. 5-1). 또한 대부분의 피층세포에는 0.1-0.7 µm 크기의 작은 액포와 폴리좀이 나타났지만(Fig. 5-2), 표피 밑의 피층세포는 세포질의 대부분이 0.2-0.9 µm 크기의 지질과립이 특징적으로 관찰되었으며 액포가 일부 나타났다(Fig. 5-3). 75% 농도로 처리된 처리구의 표피세포에서는 원형질막의 함입현상이 대조구보다 더욱 활발하고, 세포벽에는 전자밀도가 높은 물질이 층상으로 분포하였으며 세포질에는 조면소포체와 미토콘드리아가 존재하였다(Fig. 6-1). 피층세포



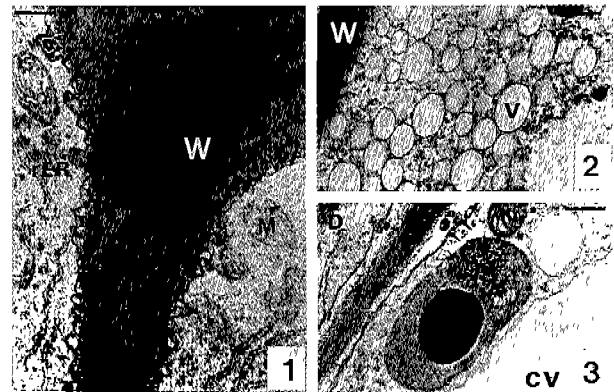
**Fig. 3.** Light photographic views ( $\times 100$ ) of transversed root tip cell of *R. sativus* var. *hortensis* for acanthiformis grown on sterile water (A), 6% extract (B), 25% extract (C), and 75% extract (D). ep, epidermis; co, cortex; s, stele. Bar=0.01  $\mu$ m.



**Fig. 4.** Light photographic views ( $\times 100$ ) of transversed root tip cell of *C. mimosoides* var. *nomame* grown on sterile water (A), 6% extract (B), 25% extract (C), and 75% extract (D). ep, epidermis; co, cortex; s, stele. Bar=0.01  $\mu$ m.

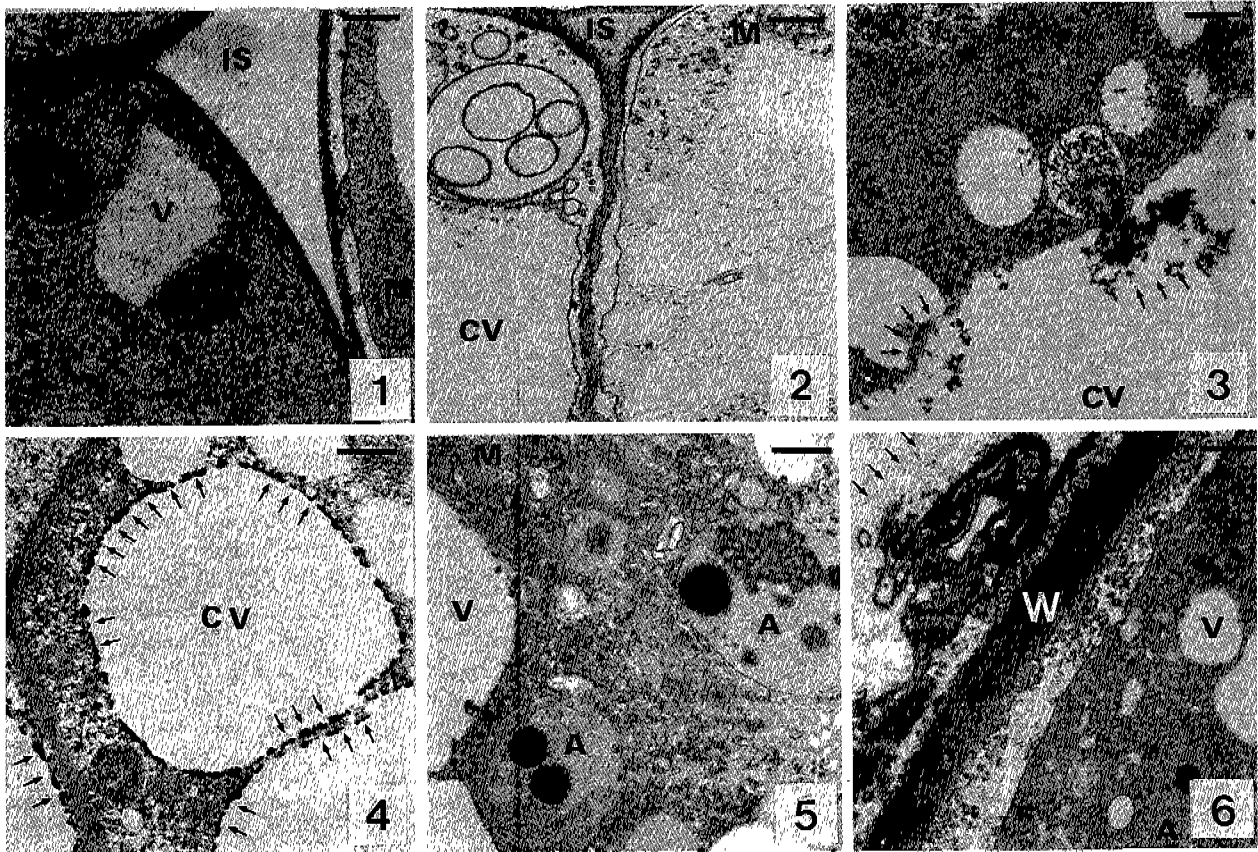


**Fig. 5.** Control sections of *R. sativus* var. *hortensis* for acanthiformis. 1. An epidermal cell showed mitochondria (M), rough endoplasmic reticulum (rER), dictyosome, proplastid (P), lipid bodies (L), and vacuoles (V) with electron-dense deposits (arrows). Bar=2.4  $\mu$ m. 2. A large number of small vacuoles (V) are characteristically seen in the cortical cell. Notice some microtubules adjacent to cell wall (W). Bar=1.5  $\mu$ m. 3. Numerous lipid bodies bounded by a single membrane are visible in the cortical cells. A lot of vesicles, possibly derived from dictyosomes are seen at the peripheral cytoplasm. Bar=3.0  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Treated sections of *R. sativus* var. *hortensis* for acanthiformis. 1. Active endocytosis occurs in the epidermal cells. Electron-dense deposits (arrows) are arranged on cell wall (W). Bar=2.4  $\mu$ m. Numerous small vacuoles are shown at the peripheral cytoplasm of the treated cortical cell with extracts. A large number of polysomes are obviously present. Bar=1.5  $\mu$ m. 3. Amyloplast (A) bounded by double membrane possess a starch grain. A mitochondrion and a dictyosome (D) with its vesicles are shown in the parenchyma cell of the stele. Bar=3.0  $\mu$ m.

는 중앙에 커다란 액포와 외부에 작은 액포들이 발달하였고 (Fig. 6-2) 중심주의 유세포들 역시 세포의 중앙에 커다란 액포가 존재하였고 특히 전분형성체가 관찰되었으며 원형질막은



**Fig. 7.** Control (1, 2) and treated (3-6) sections of *C. mimosoides* var. *nomame*. 1. A large number of different vesicles in size are accumulated in outer region of plasma membrane. Two proplastids (P) with few membranous sheet are prominent in the cortical cell, which has faced to the intercellular space (IS). Bar=2.4  $\mu$ m. 2. An enlarged secondary vacuole protruded into the central vacuole (CV) may fuse and develop into a huge one in the cortical cell. Bar=2.4  $\mu$ m. 3. Amorphous materials (arrows) of vacuoles, possibly containing extracts are discharged into the central vacuole (CV) of cortical cell. Bar=1.5  $\mu$ m. 4. In the parenchyma cells of the stele, electron-dense deposits (arrows) are accumulated in the central vacuoles along the tonoplast. Bar=1.5  $\mu$ m. 5. An electronmicrograph of the cortical cell showed the cell degeneration. Amyloplasts (A) and mitochondria (M) are still remained in the cytoplasm. Bar=2.4  $\mu$ m. 6. An electronmicrograph of the cortical cells show the early and the late developmental stages of the cell degeneration. Note the upper left-portion of the photograph showing the completely degenerated cytoplasm (arrows). Bar=2.4  $\mu$ m.

다소 세포벽으로부터 유리되어 있었으며, 이곳에는 작은 소포들이 밀집하고 있었다(Fig. 6-3). 차풀의 대조구에서 피층세포는 액포가 발달하여 세포의 대부분을 차지하였고 일부의 세포질만이 원형질막 가까이 존재하였다(Figs. 7-1, 2). 40% 처리구의 피층세포는 원형질막과 세포벽 사이에 작은 소포와 섬유상 구조물이 다수 관찰되었는데, 일부 세포는 퇴행과정이 진행되면서 세포가 점차 파괴되었다(Fig. 7-6). 또한 1.7  $\mu$ m 크기의 작은 액포들은 높은 전자밀도를 갖는 물질을 지니고 있었는데 작은 액포들이 중앙 액포로 융합되면서 이들 물질들이 액포막을 따라서 축적되었고(Figs. 7-3, 4), 세포 소기관은 점차 소실되었지만 전분형성체는 여전히 출현하였다(Figs. 7-5, 6).

## 고 찰

Jobidon과 Thibault(1981)는 *Populus balsamifera*의 잎 추출액이 오리나무의 뿌리생장, 특히 뿌리털의 발달을 억제시키고 분열조직을 괴사(necrosis)시키는 것을 확인하였는데 이것은 독성 물질로 인한 세포분열의 감소나 유묘발달의 억제 현상을 언급한 것이다. 본 실험은 세포 신장의 억제 뿐만 아니라 표피 및 피층세포의 괴사현상, 그리고 피층세포의 표피화 현상과 같이 독성 물질에 의한 식물체의 조직변화가 처리액의 농도를 상승시킬수록 점차 심화되고 있음을 관찰하였다. 이러한 사실은 식물의 영양기관 가운데 특히 뿌리에 있어서는 독성 물질에

대한 식물체의 방어작용이 매우 활발하게 나타난다는 사실을 보여주는 것이라 하겠다. 즉 무의 근단세포 전체가 구형의 규칙적인 배열이었던 것이 농도가 증가하면서 표피의 함입현상이 나타난 것을 볼 수 있었는데, 이 현상은 추출액에 의한 피해로 근단세포의 신장이 억제된다고 한 Bukolova(1971)의 견해와 부합되는 것이다. 이러한 함입현상은 고농도의 추출액에 의한 원형질의 분리현상일 수도 있는데 Elakovich와 Wootem(1991)은 삼투 퍼텐셜이 143 mosm/kg 이하인 농도는 세포에 영향을 주지 않는다고 하였고 본 추출액의 삼투 퍼텐셜은 6%(7 mosm/kg), 25%(26 mosm/kg), 75%(73 mosm/kg)으로 75% 농도의 삼투 퍼텐셜이 73 mosm/kg이므로 추출액의 고농도에 의한 근단세포의 변화가 아니라 리기다소나무의 추출액내에 포함된 allelochemical에 의한 세포의 피해로 생각할 수 있다. 한편, 차풀 종자 발아에 추출액이 처리되었을 때 6% 농도에서는 피층의 세포 크기가 대조구에 비하여 상당히 커졌는데 세포 크기는 액포와 관계가 있으므로 6% 농도에서 피층세포의 크기가 커진 것은 액포의 발달에 의한 세포 신장으로 생각된다. 또한 75% 농도에서 표피가 두터워지고 유관속 부위의 응축 현상이 나타나는 것은 피층이 표피화되면서 독성 물질에 대한 저항성을 보이는 것으로 설명할 수 있다. 특히 allelochemical에 의해 차풀에서 나타나는 특이한 현상으로는 뿌리 끝이 고사되면서 위로 향하는 근단의 음성 굴중성인데 이러한 현상은 근단내의 물질대사가 변화하면서 나타난다고 한 여러 보고와 부합되는 것이다(Koch and Wilson, 1977; Lovett *et al.*, 1987). Lovett(1982)는 투과전자현미경을 이용하여 *Camelina sativa*(양구슬냉이)에서 추출된 benzylamine이 *Linum usitatissimum*(아마)의 유근생장에 영향을 주어 처리구의 세포 소기관이 대조구에 비하여 상당히 파괴되었고 액포, 전분형성체, 지질과립이 증가하였다고 하였다. 본 실험에서 중앙액포가 발달하고 전분형성체가 형성되는 것은 Lovett(1982)와 일치되지만 대조구와 처리구간의 지질과립의 양적 변화는 오히려 대조구에서 다수 존재하던 지질과립이 처리구에서 상당히 감소한 결과는 위 보고와는 상반되었다. Allelochemical 처리구의 액포증가는 외부 스트레스에 의해 세포내에서 액포가 증가하는 autophagic role(Wierzbicka, 1987)로 해석할 수 있다. Liu와 Lovett(1990)는 thornapple과 보리에 의해서 세포가 파열되는 현상을 보고하였는데 이것은 차풀 처리구에서 나타난 세포질 퇴행현상과 일치하고 있다. 또한 대조구와 피층에서 나타난 작은 액포들이 처리구에서는 상당히 크게 중앙부위에 자리잡고 있는데 이러한 액포의 발달은 세포내의 알칼로이드와 같은 phytotoxic한 2차 대사산물에 의한 것이라고 한 Kutchan 등(1986)과 Matile(1984)의 보고와 관련이 있다고 본다. 무의 처리구와는 달리 차풀의 처리구에 있어서 특이한 현상은 증가한 액포막을 따라 전자밀도가 매우 높은 물질이 밀집되어 있는데, 이것은 세포

벽과 원형질막 사이에 균일하게 분포하던 소과립들이 작은 액포에 축적되고 이 축적물의 과립들이 커다란 액포에 방출되듯이 밀려나와 액포막을 따라 축적되는 것으로 확인되었다(Lazzaro and Thomson, 1992).

## 사 사

본 연구는 한국과학재단의 1994년도 국내 Post Doc. 연구비 지원에 의하여 일부 수행되었음.

## 인 용 문 헌

- Bhowmik, P.C. and J.D. Doll. 1984. Allelopathic effects of annual weed residues growth and nutrient uptake of corn and soybeans. *Agron. J.* 76: 383-388.
- Bukolova, T.P. 1971. A study of the mechanism of action of watersoluble substances of weeds on cultivated plants. In *Physiological Biochemical Basis of Plant Interactions in Phytocenoses*. A.M. Grootzinsky (ed.). Naukova Dumka, Kiev. (In Russian, English summary.), Vol. 2. pp. 66-69.
- Cornman, I. 1946. Alteration of mitosis by coumarin and parasorbic acid. *Am. J. Bot.* 33-217.
- Elakovich, S.D. and J.W. Wooten. 1991. Allelopathic potential of *Nuphor lutea* (L.) Siobh, and Sm. (Nymphaeaceae). *J. Chem. Ecol.* 17: 707-714.
- Jensen, T.E. and F. Welbourne. 1962. The cytological effects of growth inhibitors on excised roots of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Proc. S.D. Acad. Sci.* 41: 131-136.
- Jobiden, R. and J.R. Thibault. 1981. Allelopathic effects of balsam poplar on green alder germination. *Bull. Torrey Bot. Club.* 108: 413-418.
- Kapustka, R.L. and E.L. Rice. 1976. Acetylene reduction ( $N_2$ -fixation) in soil and old field succession in central Oklahoma soil. *Biochem.* 8: 497-553.
- Koch, S.J. and R.H. Wilson. 1977. Effects of phenolic acids on hypocotyl growth and mitochondrial respiration in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Ann. Bot.* 41: 1091-1092.
- Kutchan, T.M., M. Rush and C.J. Coscia. 1986. Subcellular localization of alkaloids and dopamine in different vacuolar compartments of *Papaver bractenm*. *Plant Physiol.* 81: 161-166.
- Lazzaro, M.O. and W.W. Thomson. 1992. Endocytosis of lanthanum nitrate in the organic acid secreting trichomes of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Am. J. Bot.* 79: 1113-1118.
- Levitt, J., J.V. Lovett and P.R. Garlick. 1984. Datura stramonium allelochemicals: Longevity in soil and ultrastructural effects on root tip cells of *Helianthus annuus* L. *New Phytol.* 97: 213-218.
- Liu, D.L. and J.V. Lovett. 1990. Allelopathy in barley potential for biological suppression of weeds. In *Alternatives to the Chemical Control of Weeds, Forest Re-*

- search Institute, Rotorua, pp. 85-92.
- Lorber, P. and W.H. Muller.** 1976. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*; Effects on seedling root tip ultrastructure. *Am. J. Bot.* **63**: 196-200.
- Lovett, J.V.** 1982. The effects of allelochemical on crop growth and development. In *Chemical Manipulation of Crop Growth and Development*. J.S. Molaren (ed.). Butterworths, London, pp. 93-100.
- Lovett, J.V., M.Y. Ryantyu and P.R. Garlick.** 1987. Allelopathic effect of thornapple (*Datura stramonium* L.). Proc. Aust. 8th Weeds Conf., Sydney, pp. 179-181.
- Matile, P.** 1984. Das Toxische Kompartiment der Pflanzencelle. *Naturwiss.* **71**: 18-24.
- Reynolds, E.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron stain for electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208-212.
- Rice, E.L.** 1984. Allelopathy. 2nd ed, Academic Press, New York and London.
- Spurr, A.R.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**: 31-43.
- Whittaker, R.H. and P.P. Feeny.** 1971. Allelochemicals: Chemical interactions between species. *Science* **171**: 757-770.
- Wierzbicka, M.** 1987. Lead accumulation and its translocation barriers in roots of *Allium cepa* L. Autoradiographic and ultrastructural studies. *Plant Cell Environ.* **10**: 17-26.

(1995. 1. 5 接受)

---

### Effect of Leaf Extract from *Pinus rigida* on Morphological Changes of Root Tips

Kim, Yong Ok, Ho Joon Lee\*, Eun Soo Kim and Young Dong Cho<sup>1</sup>  
 Department of Biology, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea; and  
<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

#### ABSTRACT

After treatment with various concentrations of the leaf extract from *Pinus rigida*, the structural changes of root tips in *Raphanus sativus* var. *hortensis* for. *acanthiformis* and *Cassia mimosoides* var. *nomame* were examined by the light and the electron microscopy. Although 6% extract treatment enhanced the cortical cell elongation in both plants, the other concentrations such as 25% and 75% changed their external features of the epidermal and cortical cells into irregular shape and size. By 75% treatment, furthermore, the epidermal region was became thicker into 7 cell layers in *C. mimosoides* var. *nomame*. In the treated epidermal cells of *R. sativus* var. *hortensis* for. *acanthiformis*, the highly electron-dense deposits were regularly arranged on the cell wall. And the invagination of plasma membrane was also observed. Amyloplasts usually appeared in both parenchyma cells of cortex and stele. However, the lipid bodies were clearly decreased in their cytoplasm. The treated root tips of *C. mimosoides* var. *nomame* have characteristically shown the various phases of cell degeneration. The electron-dense deposits were especially accumulated within the central vacuoles along the tonoplast.

*Keywords*: *Pinus rigida*, allelopathy, root tip, leaf extract

---

\*Corresponding author: Fax +82-2-456-8360