

구기자혹응애(*Eriophyes kuko* Kishida) 및 그 혹에 관한 연구

Ⅲ. 혹의 성장에 따르는 핵산함량의 변동

김 창 효*

Studies on *Eriophyes kuko* Kishida and its Galls

III. Quantitative Changes of Nucleic Acid in Growing Galls

Chang Hyo Kim*

Abstract

In this report, an experiment has been conducted to test the quantitative changes of nucleic acids in the nuclei of the epidermal cell of the galls, caused by *Eriophyes kuko* Kishida on the leaf of *Lycium chinense* Mill by means of microspectrophotometric techniques, the two-wave-length methods. And the sizes of the epidermal cells and nuclei have been measured.

The experimental results were summarized as follows:

- 1) It has been found that as the gall grows, the diameter of the epidermal cells and their nuclei increased and they were larger than those of the healthy ones.
- 2) Microspectrophotometric measurement of nuclei by the "Two-wave-length method" after staining with Feulgen reagent showed no changes in DNA content in the early stage of the gall. As the gall matured, however, DNA content of the gall increased more than that of the healthy leaf.
- 3) RNA-measurement of nuclei stained with Azur-B in DNase treated epidermal cells of the gall revealed that temporary increase in RNA content occurred in early to middle stages after the gall formation. As the gall matured, however, RNA content of the gall decreased more as against that of the healthy leaf.

서 론

식물에 병원균, 곤충 및 선충류등이 침입기생하므로
서 이루어진 이병조직(罹病組織), 혹병조직(瘦瘤
) 또는 혹조직(蟲瘦組織) 등의 이상조직(異常組織)에

있어서는 물질대사조절에 변동이 일어난다는 사실이 알
려져 있으며 특히 이러한 이상성장(異常生長)을 한 조
직의 핵과 핵산(核酸)에 관해서는 Zech²⁰⁾가 담배의
Mosaic virus 감염세포의 핵(核)의 지름이 커진다는보
고를 한바 있고, Nakagaki¹⁰⁾ 및 Misawa and Kato⁷⁾ 등
이 Tobacco mosaic virus 감염세포, Richard¹⁶⁾가 도마

*Chinju Agricultural College
진주농과대학

도의 Crown gall 세포 그리고 Owens and Specht¹³⁾ 및 Owens and Rubinstein¹²⁾ 등이 뿌리혹선충(Root knot nematodes)의 침입기생에 의하여 이루어진 도마도의 뿌리혹세포등의 연구에서 혹(Gall)이 성장함에 따라 DNA와 RNA의 함량에 변동이 일어난다는 보고를 한 바 있다.

필자는 구기자 나무(*Lycium chinense* Mill)의 잎에 구기자혹응애(*Eriophyes kuko* Kishida)가 침입기생하므로써 이루어지는 혹의 성장에 따르는 효소활성(酵素活性) 및 화학성분의 변동에 관하여 보고한데 뒤이어 핵산함량의 변동여부를 알기 위하여 혹의 성장에 따르는 표피세포와 핵의 크기를 측정하는 동시에 핵산의 함량을 측정할 그 결과를 보고한다. 끝으로 이 실험을 수행함에 있어서 여러가지 편이를 보아준 日本國 名古屋大學 農學部 武岡洋治 博士에게 진심으로 감사를 드린다.

재료 및 방법

구기자혹응애(*Eriophyes kuko* Kishida)에 의하여 구기자 나무 (*Lycium Chinense* Mill)의 잎에 형성된 혹을 발생형성 초기부터 경과일별로 크기에 따라 작은 혹(Small gall: 1~10일, 지름, 0.2~1.4mm), 중간 혹(Middle gall: 10~20일, 지름, 1.4~2.4mm), 및 큰혹(Large gall; matured gall: 20~30일, 지름, 2.4~3.2mm)의 3 단계로 나누어 잘라낸 혹과 이것을 잘라내고 남은 건전한 부분을 잘라낸 것을, DNA에 대한 Feulgen 반응에 사용할 것은 50% Formalin 으로, 그리고 RNA의 Azur B 염색에 사용할 것은 10% Formalin 으로 고정 후 상법(常法)에 의하여 13 μ 의 Paraffin 절편을 만들었다.(Flax and Himes)³⁾

1. DNA에 대한 Feulgen 반응

Feulgen 반응시험은 Stowell¹⁰⁾의 방법에 따라 Basic Fuchsin 지방인 Schiff 시약을 사용하였다. Paraffin을 제거한 절편을 1N-HCl로서 60°C에 4분 동안 가수분해(Fig. 1) 시켜 물로 씻은 다음 염색액(Sibatani and Naora)¹⁸⁾에 4시간 동안 반응시켜 염색하여 세정액(洗淨液)으로 15분간씩 3회 씻은후 탈수하여 Canada balsam 으로 봉입하였다.

2. RNA에 대한 Azur B 염색

Paraffin을 제거한 절편을 Brachet¹¹⁾의 방법에 따라 0.003M-MgSO₄(pH6.5) 1ml에 DNase 0.5mg를 녹인 용액에 넣어 실온에서 3~6시간 처리하여 물로 씻은

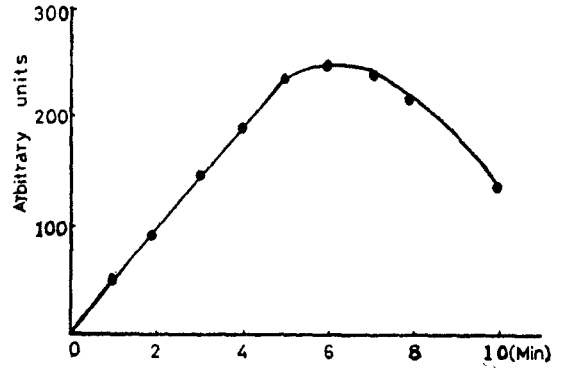


Fig. 1. The effect of times of N-HCl hydrolysis at 60°C for Feulgen reaction of healthy leaf tissue of *Lycium chinense* Mill

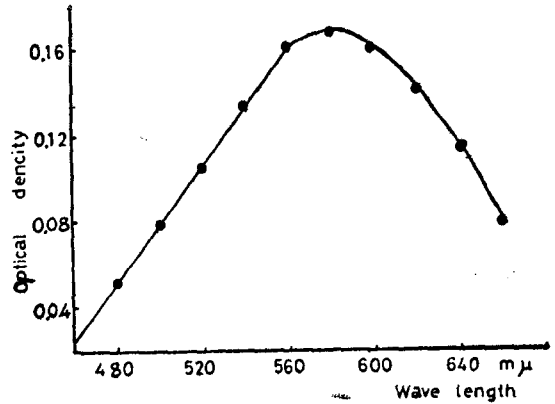


Fig. 2. Absorption curve of nuclei stained with Feulgen reagent in healthy leaf tissue of *Lycium chinense* Mill.

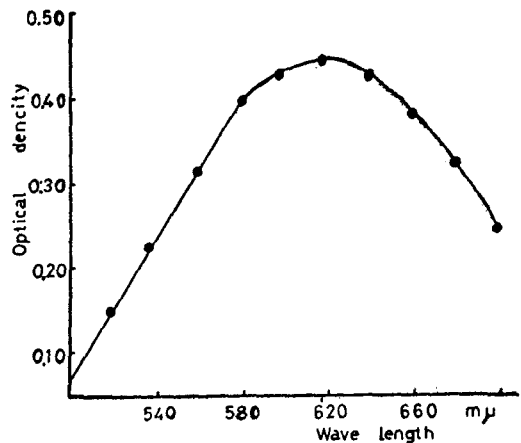


Fig. 3. Absorption curves of nucleoli stained with Azur B in healthy leaf tissue of *Lycium chinense* Mill.

후 Mallvaine 의 완충액 (pH4.0)에 녹인 0.025% Azur B 로 40°C 에서 3 시간 동안 염색하여 충분히 씻은 후 3 급 Buthanol 로서 18 시간 동안 분별(分別)하였다.

3. 현미분광측정법 (Microspectrophotometric method)

현미분광측정기 (Microspectrophotometer: MSP-A—IV, Olympus)로 Patau¹⁵⁾의 two—wave length method (二波長法)에 의하여 표피세포의 핵의 DNA 는 500m μ 와 560m μ 에서 RNA 는 580m μ 에서 측정하였다.

결과 및 고찰

구기자혹응애 (*Eriophyes kuko* Kishida)에 의하여 구기자 나무 (*Lycium chinense* Mill)의 잎에 형성되는 혹의 표피세포와 핵의 크기를 측정하는 동시에 핵산 (DNA, RNA)의 함량을 측정한 결과 건전한 잎에 있어서는 잎이 성장함에 따라 표피세포가 점차로 커지는데 비하여 핵은 커지지 않는다. 그러나 혹에 있어서는 혹이 성장함에 따라 표피세포가 점차로 커지는 동시에 핵도 커지고 건전한 것보다 2 배나 커졌음을 알 수 있다. (Table 1). 따라서 구기자혹응애의 침입으로 인한 자극과 분비 또는 배설물등의 작용에 의하여 구기자 나무의 잎의 표피세포는 이상비대를 하여 그의 핵도 건전한 것보다 커지는 현상이 일어남을 알 수 있다.

DNA 의 함량은 혹의 형성초기 일때에는 건전한 것과 차이가 거의 없는 것 같으나 혹이 성장함에 따라 함량으로 표시되는 농도분포가 증가한 핵이 나타남을 알 수 있다 (Fig. 4). RNA 의 함량은 혹의 형성 초기부터 증가까지는 일시적으로 증가하는 것 같으나 혹이 성장

Table 2. The RNA content of nucleoli in gall tissue and healthy leaf tissue of *Lycium chinense* Mill.

	Number observed	Healthy leaves	Gall
Small	120	0.2648	0.3300
Middle	120	0.2915	0.3942
Large(matured)	120	0.3128	0.2583

Note: Tables Show the optical density at 580m μ in D Nase treated and Azur B-stained nucleoli.

하게 되면 감소되며 오히려 건전한 것보다 감소되는 경향이 나타남을 알 수 있다. (Table 2). 이러한 현상은 식물에 혹이 형성되어 성장함에 따라 표피세포가 이상비대하여 커지는 동시에 그의 핵이 커지는 것은 담배의 Mosaic virus 에 감염된 세포에 있어서 핵이 점차로 커지는 현상 (Zech)²⁰⁾과 비교할 때 식물은 기생생물의 종류여하를 막론하고 침입을 받게 되면 세포가 이상생장을 하여 핵의 형태에도 변동이 일어난다는 것을 알 수 있다. 그리고 DNA 와 RNA 등의 함량의 증가에 관해서는 Misawa and Kato⁷⁾가 담배의 Mosaic virus 접종 실험에서 접종 초기에는 DNA 의 함량으로 표시되는 농도 분포가 일시적으로 증가한 핵이 나타나지마는 시간이 경과됨에 따라 감소하며 건전한 것과 같게되고, RNA 의 함량은 접종초기에는 일시적으로 증가하고 시간이 경과함에 따라 전전부 보다 오히려 감소되는 경향이 보이는데 이러한 현상은 Virus 의 감염에 의한 개개의 핵의 DNA 및 RNA 의 합성 속도가 변동하기 때문일 것이라고 하였고, Nakagaki¹⁰⁾는 담배의 Mosaic virus 의 감염세포에 있어서 접종후 6~10일까지는 핵이

Table 1. Comparison of the hypertrophied epidermal cells and its nuclei of the galls on leaves of *Lycium chinense* Mill caused by *Eriophyes kuko* Kishida.

	Healthy leaves		Galls		
	Tangential	Radial	Tangential	Radial	
Epidermal cells	Small	28.87 \pm 2.45	16.47 \pm 1.43	38.93 \pm 1.79	21.30 \pm 1.66
	Middle	35.17 \pm 2.66	21.56 \pm 2.57	98.40 \pm 4.17	41.90 \pm 1.01
	Large(matured)	49.60 \pm 2.45	26.67 \pm 1.66	153.2 \pm 9.92	66.00 \pm 4.57
	Enlarged	1.72	1.62	3.94	3.11
Nuclei of epidermal cells	Small	7.08 \pm 0.23	6.96 \pm 0.24	10.08 \pm 0.41	10.13 \pm 0.51
	Middle	7.12 \pm 0.24	7.04 \pm 0.22	16.37 \pm 0.68	14.92 \pm 0.58
	Large(matured)	7.20 \pm 0.25	7.16 \pm 0.25	21.17 \pm 0.88	20.07 \pm 0.74
	Enlarged	1.02	1.03	2.10	2.00

*Numbers observed: 120

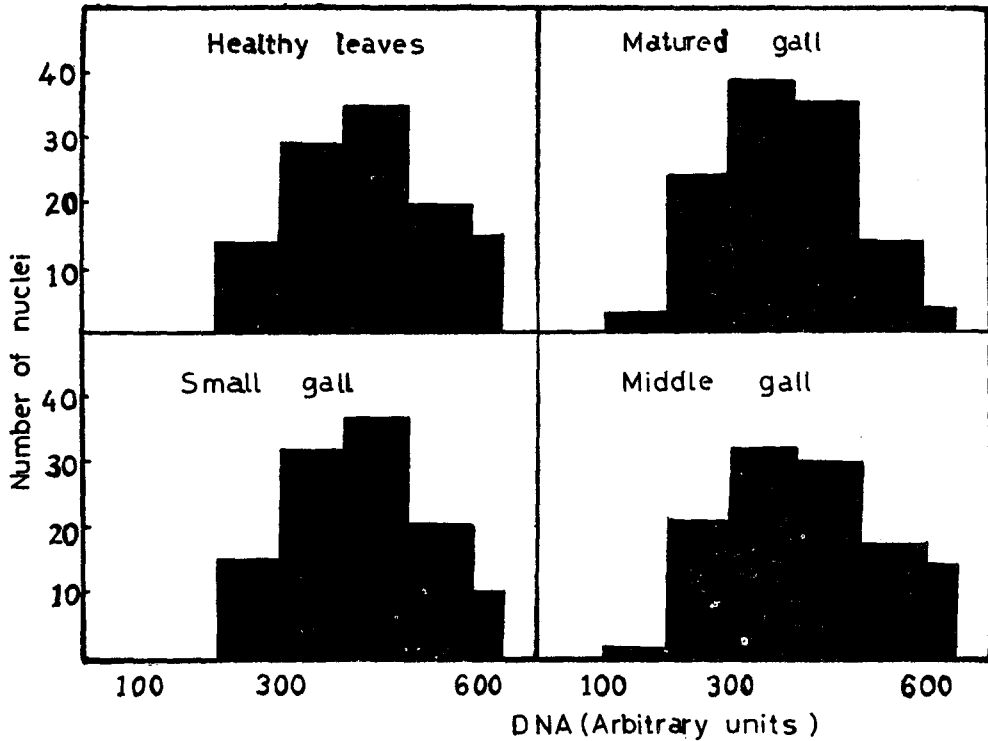


Fig. 4. The level of DNA per nuclei in the mite gall tissue on leaves of *Lycium chinense* Mill caused by *Eriophyes kuko* Kishida. Photometric units in abscissa are calculated by two-wave length method.

커지나 인(仁)은 반드시 커지지 않으며 접종후 일시적으로서는 DNA와 RNA의 함량이 증가하나 시일이 지나면 감소되어 건전한 것보다 오히려 감소되는 경향이 보이는데 이러한 현상은 RNA의 대사활성(代謝活性)의 변동 때문일 것이라고 보고 하였다. Richard¹⁰⁾는 도마도의 Crown gall에 있어서 감염된후 짧은 시간내의 이병조직세포(罹病組織細胞)의 DNA의 함량(함량으로 표시되는 농도분포)이 증가하는 현상이 일어난다고 하였고, Clark²⁾는 식물의 Tumor cell은 일반적으로 핵산의 합성이 빨리 이루어진다고 하였다. 그리고 Owens and Rubinstein¹²⁾은 도마도 뿌리 혹선충의 침입에 의하여 이루어진 뿌리 혹(根瘤)은 핵산(核酸)이 증가한다고 하였다.

이상의 Virus의 기생에 의한 감염부나 병원균류의 기생에 의한 Crown gall 또는 혹선충류의 침입에 의한 뿌리혹 즉 이상생장을 한 세포에 있어서 핵산이 증가하는 현상과 같이 구기자혹응애의 침입기생에 의하여 구기자 나무의 잎에 형성된 혹의 표피세포에 있어서도 혹이 성장함에 따라 세포가 커지는 동시에 DNA와 RNA

의 함량(함량으로 표시되는 농도분포)에 변동이 일어나는 것은 이상생장을 한 혹세포에 있어서 물질대사조절(物質代謝調節)에 변동이 일어나 핵산의 합성(合成)속도(速度)가 빨리 일어나기 때문에 일어나는 현상일 것으로 추측된다.

적 요

구기자혹응애(*Eriophyes kuko* Kishida)의 침입 기생에 의하여 구기자나무(*Lycium chinense* Mill)의 잎에 형성되는 혹(Mite gall)의 성장에 따르는 표피세포(表皮細胞)와 핵(核)의 크기를 측정하는 동시에 핵산(DNA, RNA)의 함량(함량으로 표시되는 농도분포)을 현미분광측정기(Microspectrophotometer)로 측정하고 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 혹이 성장함에 따라 표피세포와 핵이 커지며 건전한 것보다 크게 된다.
2. DNA의 함량(함량으로 표시되는 농도분포)은 혹이 형성되는 초기에는 별로 변동이 없는 것 같으나 성

장한 후에 있어서는 건전한 것보다 오히려 증가하는 경향이 보였다.

3. RNA의 함량(함량으로 표시되는 농도분포)은 흑이 형성되는 초기부터 중기까지는 일시적으로 증가하는 것 같으나 흑이 성장하게 되면 건전한 것보다 오히려 감소되는 경향이 보였다.

참 고 문 헌

1) Brachet, J. 1953. The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. *Quart. J. Microscop. Sci.* 94:1-10.
2) Clark, G.A. 1960. The metabolism of the cancer cell. P. 877-925. in Nowinski, Wiktor W., ed. *Fundamental aspects of normal and malignant growth.* p.1025. Elsevier Publishing Co., New York.
3) Flax, M.H. and M. Himes. 1952. Metachromasy in nucleic acid staining with Azur B. *Physiol. Zool.* 25:297-311.
4) Hirai, T. and S.G. Wildman. 1963. Cytological and Cytochemical observations on the early stage of infection of tomato hair cells by tobacco mosaic virus. *Plant and Cell Physiol.* 4:265-275.
5) LeBreton, E. and Y. Moule. 1961. Biochemistry and physiology of the cancer cell. p.497-544. in Brachet, Jean and Alfred E. Mirsky, eds. *The cell.* Vol. 5:597. Academic press, New York.
6) Martin, H.F. and H.H. Marion. 1952. Microspectrophotometric analysis of metachromatic staining of nucleic acids. *Physiological Zoölogy.* 25(4):297-311.
7) Misawa, M. and S. Kato. 1964. The change of DNA and RNA content in cell nucleus of CMV-infected leaves. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 29(2):78.
8) Mortimer, L. and M.D. Mendelsohn. 1958. The two-wave length method of microspectrophotometry. 11. A set of tables to facilitate the calculations. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:415-424.
9) 永田哲士, 1956. 顯微分光測定法の理論と應用.

信州醫誌 第15卷 第2號 : 1-10

10) Nakagaki, 1965. Microspectrophotometric studies on the amount of nucleic acid and protein in the nucleus of tobacco leaves during the course of tobacco mosaic virus infection. Faculty of Agriculture, Nagoya University.
11) Owens, R.G. and R. F. Bottino. 1966. Changes in host cell wall composition induced by root-knot nematodes. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 23:171-180.
12) Owens, R.G. and J.H. Rubinstein. 1966. Metabolic changes induced by root-knot nematodes in host tissues. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 23:199-213.
13) Owens, R.G. and H.N. Spech. 1966. Biochemical alternations induced in host tissues by root-knot nematodes. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 23:181-198.
14) Patau, K. 1952. Absorption microphotometry of irregular shape objects. *Chromosoma* 5:341.
15) Patau, K. and D. Srinivasachar. 1960. A microspectrophotometer for measuring the DNA-content of nuclei by the two wave length method. *Cytologia.* 25:145-151.
16) Richard, M.K. 1952. Nitrogen and phosphorus fractions respiration and structure of normal and crown gall tissue of tomato. *Plant physiology.* 27:335-354.
17) 妹尾左知丸. 1965. 顯微分光測定法とその生物學への應用. 蛋白質核酸酵素. 10(11):87-102.
18) Sibatani, A. and H. Naora. 1954. Feulgen reaction and quantitative cytochemistry of deoxyribose nucleic acid. V. Chemical determination of color intensity of the reaction in situ. *Biochem. Biophys. Acta.* 13:66-71.
19) Stowell, R.E. 1945. Feulgen reaction for thymonucleic acid. *Stain Technology.* 20:45-48.
20) Zech, H. 1961. Cytochemische Untersuchungen zur Reproduktion des Tabakomosaikvirus. I. UV-spektrophotometrische Messungen an isolierter Virussubstanz. *Z. Naturforsch.* 16 B: 520-538.