

## 고사리삼 地下莖에서 有限 維管束 形成層의 微細構造 및 組織化學

李 圭 培 · 蘇 雄 永<sup>1\*</sup>

朝鮮大學校 師範大學 生物教育科, <sup>1</sup>全北大學校 自然科學大學 生物學科

고사리삼 지하경 형성층의 활성과 연령의 관계를 확인하기 위하여 경정부로부터 제 6절간 및 제 10절간의 형성층 세포를 미세구조 및 조직화학적으로 비교하였다. 제 6절간의 형성층은 규칙적으로 2-4세포의 방사배열을 하고 방사방향으로 납작한 구조와 얇은 접선벽을 가지고 있다. 미세구조 관찰에서 형성층 세포는 중앙부에 커다란 액포가 발달되어 있고 미토콘드리아, 소포체 및 디티오솜이 분포되어 있는 반면에 전분립 등의 저장물질은 관찰되지 않았다. 한편 제 10절간 형성층의 세포들은 방사방향으로 약간 확장되어 있고 방사배열을 보이지 않았다. 미세구조에서는 약간의 미토콘드리아 이외에는 세포소기관이 관찰되지 않았고 세포질에 많은 지질과립 및 전분과립과 작고 수많은 액포가 분포되어 있었다. 또한 제 6절간 형성층은 강한 acid phosphatase 활성을 띠고 있으나 제 10절간에서는 활성반응이 나타나지 않았다. 이상과 같은 결과로부터 제 6절간 형성층은 활성을 가지고 있으나 제 10절간 형성층은 휴면상태에 있는 것이 확실하므로 고사리삼의 지하경은 한시적인 형성층을 가지고 있다는 결론에 도달하게 되었다.

주요어: 유한 유관속 형성층, 미세구조, 조직화학, 고사리삼 지하경

종자식물의 비대생장은 유관속 형성층으로부터 2기 유관속 조직의 분화로 이루어지며 유관속 형성층에서는 매년 활성기와 휴면기가 나타나 계절적으로 구성세포의 미세구조에서 세포 배열, 세포벽, 저장물질 및 액포화 등의 변화를 보이게 된다(Srivastava, 1966; Srivastava and O'Brien, 1966; Robards and Kidwai, 1969; Evert and Desphande, 1970; Timell, 1973; Cateson, 1974, 1990; Riding and Little, 1986). 또한 구성세포의 효소활성에도 변화가 나타난다(Studhalter *et al.*, 1963; Cateson, 1974). 이와 같은 식물은 일생 동안 유관속 형성층의 활성이 이어져서 무한 비대 성장을 하게 된다.

그러나 비대생장을 하는 것으로 알려진 일부의 화석 은화 식물은 유한 형성층을 가지고 일정 분량의 비대성장만을 한 것으로 알려졌다(Arnold, 1960; Cichan, 1985). 현존 은화식물인 고사리삼과의 *Botrypus*(Kato, 1987; Takahashi and Kato, 1988) 및 *Botrychium*(Kato, 1987; Hong and Soh, 1993; Soh and Kim, 1993) 등은 유관속 형성층에 의한 비대생장을 하는 것으로 알려져 있는 특징적인 식물이다. 고사리삼의 지하경은 수년간 성장한 기부가 1~2년 성장한 선단부보다 직경이 작으므로 유관속 형성층의 활성이 일생 동안 계속되는 것이 아니라 일정 기간만 활성을 보이는 유한 형성층을 가지고 있는 것으로 추정된다(Hong and Soh, 1993). 그래서 이에 대한 확인을

위하여 유관속 형성층의 미세구조 및 조직화학적 특성을 조사하여야 할 필요가 있다. 그러므로 본 연구에서는 고사리삼의 지하경의 기부와 선단부의 유관속 형성층을 전자현미경적 및 조직화학적으로 관찰하여 그 활성을 비교함으로써 유관속 형성층의 유한성 여부를 판단하고자 한다.

### 재료 및 방법

고사리삼[*Botrychium ternatum* (Thunb.) Sw.]은 광주시 근처에서 1993년 9월 13일에 4개체를 채집하였으며, 지하경의 제 6 및 10절간에 위치하는 유관속 형성층을 1 mm<sup>3</sup> 정도로 절단하여 재료로 사용하였다. 제 6절간 부위는 지상에 나와 있는 제 5엽의 바로 아래 부위로서 다른 부위에 비해 직경이 더 컸고 또한 제 10절간 부위는 지하경의 기부에 가깝고 제 6절간에 비하여 직경이 작았다.

광학 및 전자현미경의 관찰을 위해 재료는 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 6.8)을 사용한 2.5% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 2~4시간 전고정시켰다. 동일한 완충액으로 세척한 다음에 재료는 1% osmium tetroxide 용액으로 5℃의 냉장고에서 8~10시간 후고정시켰다. 그리고 acetone으로 탈수시킨 후에 epon 혼합액에 포매하였다(Luft, 1961). LKB-V 초박절편기로 유리칼을 사용하여 얻은 두꺼운 절편은 0.05% toluidine blue로 염색한 후, Olympus BH2 광학현미경으로 관찰하였고, 금은색 절편은 uranyl

\*교신저자: Fax (0652) 70-3362  
© 한국식물학회 [서울] 1995

**Table 1.** Number of radially seriated tracheids of the secondary xylem in the rhizome of *B. ternatum*

Internode <sup>a</sup>	4th	6th	8th	10th
Tracheid	7± 0.93	15± 1.49	12± 1.32	6± 0.95

<sup>a</sup>from the shoot apex.

acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 하여 JEM 100 CXII 투과전자현미경으로 80 kV에서 관찰하였다.

유관속 형성층에서 acid phosphatase 활성의 확인을 위하여 9월에 제 6 및 10절간 부위를 각각 면도칼을 사용하여 생체 절편을 만들어 Gomori 방법으로 실험하였다(Gomori, 1952). 대조군 실험을 위해서 생체 절편을 100 °C의 끓는 물에 잠깐 담가두었다가 같은 방법으로 실험하였다.

## 결 과

고사리삼 지하경에서 제 1~5절간은 신장 생장이 대단히 저조한 부위로서 형성층이 분화 중이거나 또는 분화의 초기 상태에 있는 부분이다(Hong and Soh, 1993; Soh and Kim, 1993).

지하경의 부위별로 비대성장 상태의 확인을 위하여 횡단면에서 2기 목부의 가도관 방사열을 관찰한 결과 기부인 제 10절간 부위 및 정단부근의 제 4절간 부위의 방사열 수가 적고, 중간부위인 제 6절간이 가장 많았다(Table 1). 형성층의 활성을 비교하기 위하여 활성기의 활발한 비대생장이 일어나는 부위인 제 6절간과 대체로 비대생장이 저조하거나 정지되어 있는 것으로 보이는 제 10절간에 있는 형성층의 세포의 방사배열, 세포벽 비후상태 및 세포질 등의 미세구조 및 acid phosphatase의 조직화학반응을 비교 관찰하여 활성 여부를 검토하였다.

### 제 6절간 형성층

광학현미경하에서 9월의 형성층에서 규칙적으로 방사열을 이룬 세포의 수가 2~4세포였으며 세포들은 방사방향으로 매우 납작한 구조를 가지고 있었다(Fig. 1). 전자현미경적인 관찰에서 목부요소와 인접한 형성층 세포들은 비교적 얇은 점선세포벽을 가지며, 세포벽은 점선벽이 방사벽보다 뚜렷하게 얇으므로 병충분열이 일어나는 것으로 판단된다. 세포 중앙부에 커다란 액포가 발달되어 세포벽 주변으로 밀려 있는 얇은 세포질 속에 미토콘드리아, 소포체, 그리고 디티오솜 등의 세포소기관이 포함되어 있었다(Fig. 3). 커다란 액포의 발달과 아울러서 세포질에 전분립 등의 저장물질은 거의 관찰되지 않은 점 등으로부터 형성층의 활성은 확인할 수 있었다.

### 제 10절간 형성층

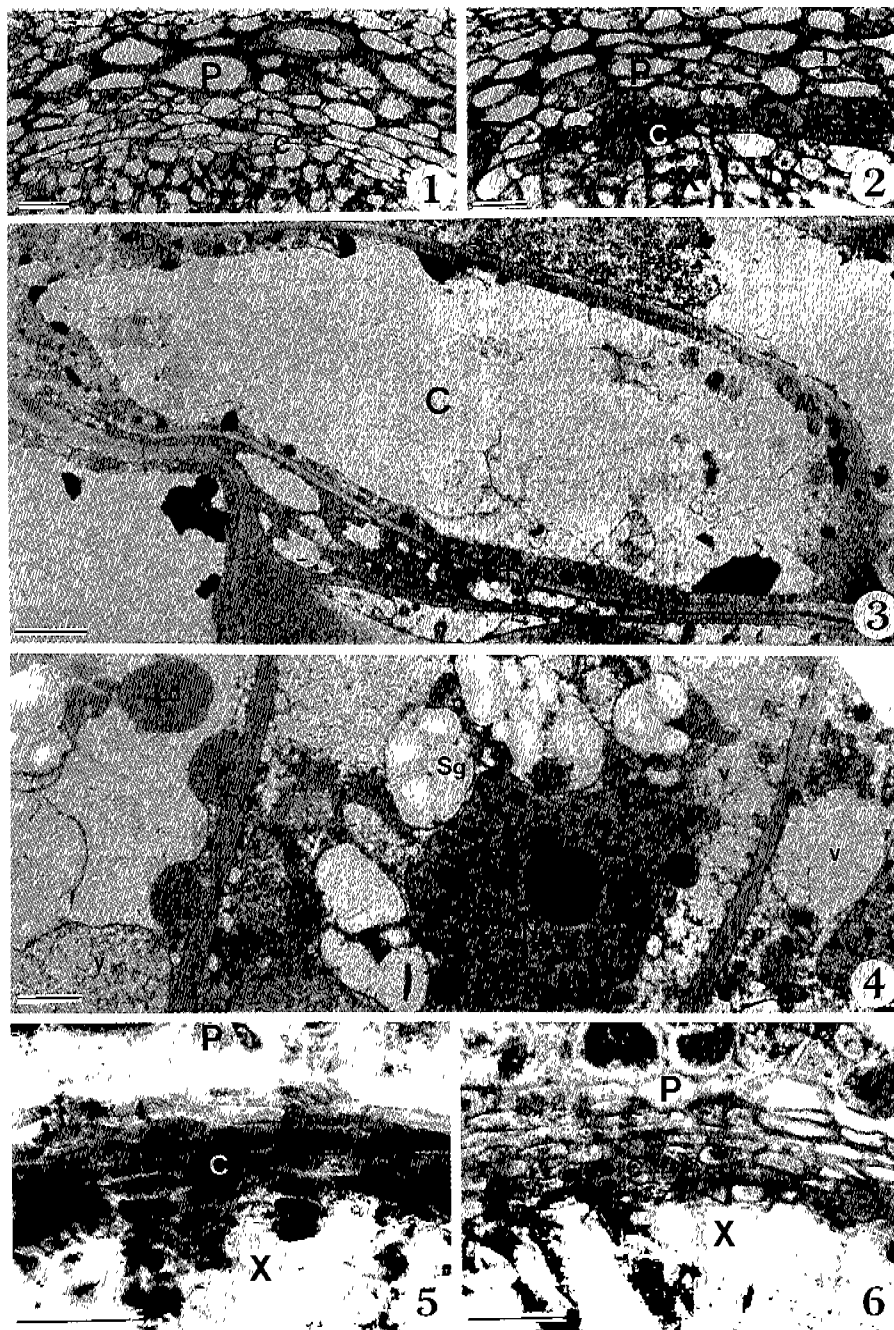
상기와 같은 시기에 제 10절간의 대부분의 형성층 세포들은 방사방향으로 확장되어 있으며 방사열을 이룬 세포가 별로 없었으므로 병충분열이 거의 일어나지 않는 것으로 보인다(Fig. 2). 미세구조에서 형성층 세포들은 많은 지질과립, 그리고 색소체 속에는 여러 개의 전분과립이 들어 있었다. 또한 수많은 작은 액포들과 약간의 미토콘드리아 이외에 다른 세포소기관들은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이와 같은 사실로부터 제 10절간의 형성층은 활성을 가지고 있지 않은 것으로 판단된다.

### 조직화학적 관찰

활발한 분열 활성을 보였던 제 6절간의 형성층에서 납황화물(lead sulfide)이 방사배열된 세포들에 짙게 침전되어 강한 acid phosphatase의 활성을 보였으며(Fig. 5), 형성층 이외의 세포에서는 효소활성 반응이 나타나지 않았다. 한편 제 10절간 형성층에서는 납황화물의 침전을 관찰할 수 없어서 이 효소의 활성이 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 6). 따라서 제 6절간의 형성층은 활성을 가지고 있으나 제 10절간의 형성층은 활성이 없는 것으로 판단된다.

## 고 찰

고사리삼 지하경에서 형성층의 활성은 7월에 나타나기 시작하여 9월에 제 6절간에서 가장 활발하였으며(Lee and Soh, 1995). 형성층대에서 강한 acid phosphatase의 활성이 나타났다. 이렇게 형성층 활성과 효소의 활성이 일치하여 나타나는 것은 고사리삼의 생활환과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다. 고사리삼은 6월 말경에 지상부에 나와 있던 성숙한 영양염병이 시들고 그 엽병 기부 액부에 들어 있던 어린 잎이 새로 자라 나온다. 이와 함께 7월 말경에 영양엽의 기부 근처에서 포자낭으로 발달할 포자엽(생식엽)이 성장하기 시작하여, 9월에 약 20 cm 이상으로 자라고 이 무렵에 포자가 성숙된다. 그 후 포자가 산포되고 12월이 되면 생식엽은 시들고 영양엽은 다음해 6월까지 남는다(Hong and Soh, 1993). 이와 같은 현상은 고사리삼 지하경의 형성층 활성이 지상부 기관 특히 생식엽의 성장과 관련되어 있는 것으로 해석된다(Lee and Soh, 1995). 포자엽이 활발하게 성장하는 시기인 9월의 제 6절간 형성층대에서 강한 acid phosphatase의 활성이 나타나는 것은 거의 모든 형성층 세포들 속에 있던 저장물질이 이 효소의 활발한 소화작용으로 분해되어 생식기관의 발생과정에 사용되기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 고사리삼에서 지하경의 형성층에 저장된 저장물질까지도 모두 분해되어 생식기관의 발달에 대자물질로 공급되는지에 대한 실험적인 확인이 필요하게 되



**Figs. 1-6.** 6-year-old cambia (Figs. 1, 3, and 5) and 10-year-old cambia (Figs. 2, 4 and 6) in *Botrychium ternatum* rhizome. Figs. 1 and 2. Light micrographs of cambium. Fig. 1. Cambial cells (C) lying between phloem (P) and xylem (X) are highly vacuolated and flattened. Bar=11  $\mu$ m. Fig. 2. Cambial cells (C) are filled with numerous storage materials such as lipid droplets and starch grains, and they are expanded radially. P, phloem; X, xylem. Bar=10.8  $\mu$ m. Fig. 3 and 4. Electron micrographs of cambium. Fig. 3. Highly vacuolated cambial cells (C) contain a thinner tangential walls (TW) and had a thin layer of cytoplasm in which mitochondria (M), dictyosome (D), and endoplasmic reticulum (arrowhead). Bar=2  $\mu$ m. Fig. 4. Cambial cells have small vacuoles (V) and a thicker tangential walls (TW), and they contain lots of starch grain (Sg) within plastids and lipid droplet (Ld). N, nucleus. Bar=1.8  $\mu$ m. Figs. 5 and 6. Light micrographs of histochemical localization of acid phosphatase. Fig. 5. Dark precipitations of lead sulfide deposited in the cambial cells (C) between phloem (P) and xylem (X) at the 6th internode show a strong activity of acid phosphatase. Bar=11  $\mu$ m. Fig. 6. Precipitation of lead sulfide in the cambial cells (C) at the 10th internode is invisible. Dark dots within the cells between phloem (P) and xylem (X) are starch grains. Bar=10.1  $\mu$ m.

었다.

한편, 제 10절간의 형성층에서는 acid phosphatase의 활성을 관찰할 수 없었으므로 활성기임에도 불구하고 휴면상태를 유지하면서 유조직화된 일종의 유한 형성층으로 남아 있는 것이며(Arnold, 1960; Lee and Soh, 1995), 이와 같은 사실은 형성층의 세포분열은 물론 acid phosphatase와 같은 효소의 활성도 나타나지 않은 것으로부터 입증될 수 있다. 또한 제 10절간의 형성층에는 전분립 및 지질 등의 저장물질이 활성기에도 제 6절간에서와 같이 분해되지 않고 유지되므로 활성을 나타내지 않는 증거가 될 수 있다. 종자식물의 휴면기 형성층 세포에는 액포가 작고 많은 수로 나뉘지며 전분 등의 저장 물질로 충만된다(Kidwai and Robards, 1969; Kruatrachue and Evert, 1977; Little and Wareing, 1981; Riding and Little, 1986; Catesson, 1990).

고사리삼 지하경의 활성기에 있는 제 6절간의 형성층은 방사열을 이룬 2~4세포를 가지고 있으며 제 10절간의 경우는 방사열이 거의 이루어져 있지 않으므로 활성을 가진 형성층이라는 구조적 특징을 찾아볼 수 없다. 종자식물에서 2기 생장중인 형성층은 구성 세포가 방사방향으로 규칙적인 배열을 하고 있으므로 형성층 활성에 대한 지표로 삼을 수 있으며 스트로브스 소나무의 형성층의 활성기(6월)에 방사열 세포가 15개, *Acer pseudoplatanus*는 4~10개, 그리고 *Ulmus americana*는 7~9개인데 반해서 휴면기에는 훨씬 적은 수를 가지고 있다(Srivastava and O'Brien, 1966; Evert and Deshpande, 1970; Catesson, 1974). 이와 같은 사실로부터 고사리삼의 형성층은 종자식물보다 훨씬 저조한 활성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비(BSRI-93-427)의 지원으로 수행된 결과의 일부임.

## 인 용 문 헌

- Arnold, C.A. 1960. A lepidodendrid stem from Kansas and its bearing on the problem of cambium and phloem in Paleozoic lycopods. *Contrib. Mus. Paleontol. Univ. Mich.* 10: 249-269.
- Catesson, A.M. 1974. Cambial cells. In *Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure*. A.W. Robards (ed.). McGraw-Hill, London, pp. 358-390.
- Catesson, A.M. 1990. Cambial cytology and biochemistry. In *The Vascular Cambium*. M. Iqbal (ed.). Research Studies Press, Taunton, pp. 63-112.
- Cichan, M.A. 1985. Vascular cambium and wood development in carboniferous plants. 1. Lepidodendrales. *Am. J. Bot.* 72: 1163-1176.
- Evert, R.F. and B.P. Deshpande. 1970. An ultrastructural study of cell division in the cambium. *Am. J. Bot.* 57: 942-961.
- Gomori, G. 1952. *Microscopic Histochemistry: Principles and Practice*. University of Chicago Press, Chicago.
- Hong, S.S. and W.Y. Soh. 1993. Vascular meristem and secondary growth in the rhizome of *Botrychium ternatum*. *Phytomorphology* 43: 151-160.
- Kato, M. 1987. A phyogenetic classification of Ophioglossaceae. *Gard. Bull. Singapore* 40: 1-14.
- Kidwai, P. and A.W. Robards. 1969. On the ultrastructure of resting cambium of *Fagus sylvatica* L. *Planta* 89: 361-368.
- Kruatrachue, M. and R.F. Evert. 1977. The lateral meristem and its derivatives in the corm of *Isoetes muricata*. *Am. J. Bot.* 64: 310-325.
- Lee, K.B. and W.Y. Soh. 1995. Comparative anatomy and ultrastructure of active and dormant vascular cambium in rhizome of *Botrychium ternatum*. *J. Plant Res.* 108: in press.
- Little, C.H.A. and P.F. Wareing. 1981. Control of cambial activity and dormancy in *Picea sitchensis* by indole-3-acetic acid and abscisic acid. *Can. J. Bot.* 59: 1480-1493.
- Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy embedding materials. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 799-802.
- Riding, R.T. and C.H.A. Little. 1986. Histochemistry of the dormant vascular cambium of *Abies balsamea*: changes associated with tree age and crown position. *Can. J. Bot.* 64: 2082-2087.
- Robards, A.W. and P. Kidwai. 1969. A comparative study of the ultrastructure of resting and active cambium of *Salix fragilis* L. *Planta* 84: 239-249.
- Soh, W.Y. and Y.S. Kim. 1993. Ultrastructure of vascular meristems in the rhizome of *Botrychium ternatum*. *Korean J. Bot.* 36: 357-362.
- Srivastava, L.M. 1966. On the fine structure of the cambium of *Fraxinus americana* L. *J. Cell. Biol.* 31: 79-93.
- Srivastava, L.M. and T.P. O'Brien. 1966. On the ultrastructure of cambium of *Pinus strobus* L. *Protoplasma* 61: 257-276.
- Studhalter, R.A., W.S. Glock and S.R. Agerter. 1963. Tree growth: some histochemical chapters in the study of diameter growth. *Bot. Rev.* 29: 245-365.
- Takahashi, A. and M. Kato. 1988. Developmental anatomy of vascular cambium and periderm of *Botrychium virginianum* and its bearing on the systematic position of Ophioglossaceae. *Bot. Mag., Tokyo* 101: 373-385.
- Timell, T.E. 1973. Ultrastructure of the dormant and active cambial zones and the dormant phloem associated with formation of normal and compression woods in *Picea abies* (L.) Karst. SUNY. Coll. Environ. Sci. For. Publ., 96, Syracuse, New York, 180 pp.

(1994. 12. 16 接受)

---

Ultrastructure and Histochemistry of Determinate Vascular Cambium  
in Rhizome of *Botrychium ternatum*

Lee, Kyu-Bae and Woong-Young Soh<sup>1\*</sup>

*Department of Biological Science Education, Chosun University, Kwangju 501-756, Korea; and*

*<sup>1</sup>Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea*

ABSTRACT

In order to clarify the relationship between the activity and age of vascular cambium in the rhizome of *Botrychium ternatum*, the cambia of the 6th and 10th internodes from its shoot apex were compared ultrastructurally and histochemically. The cambium in the 6th internode had two to four radially arranged cells in each row, and the cells are radially flattened and had thinner tangential walls than radial. The cambial cells were ultrastructurally characterized by the presence of a large vacuole, few storage materials such as starch grains and lipid droplets, and various cell organelles such as mitochondria, endoplasmic reticulums and dictyosomes in cytoplasm. On the other hand, the cells of cambium in the 10th internode showed irregular arrangement and somewhat enlargement in radial plane. The cells were filled with numerous storage materials and small vacuoles and had few cell organelles except for mitochondria. In addition, the activity of acid phosphatase appeared in the cambium of the 6th internode but of the 10th. From the above results, it is clear that the vascular cambium of the 6th internode was active and that of the 10th was dormant. Thus we reached a conclusion that the rhizome of *Botrychium ternatum* has determinate cambium.

*Keywords* : determinate vascular cambium, ultrastructure, histochemistry, *Botrychium ternatum* rhizome

---

\*Corresponding author: Fax +82-652-70-3362