

노랑초파리의 야생형과 흔적날개 돌연변이체의 날개 성체원기
발달에 관한 전자현미경적 연구

李 夏 珪 · 李 廷 珠
(서울대학교 自然大 動物學科)

A comparative study on the ultrastructures of the imaginal wing discs of
the wild type and the mutant vestigial of *Drosophila melanogaster*

Ha Kyu Lee and Chung Choo Lee
(Department of Zoology, Seoul National University)
(Received December 2, 1982)

SUMMARY

The differences in the electron microscopic fine structures of the wing imaginal discs of the vestigial (*vg*), wing mutant and wild type of *Drosophila melanogaster* were investigated. The materials used in this study were collected at ten hours intervals from the late third instar larvae of the both stocks.

The fine structural changes during differentiation were as follows;

1. In wild type lipid droplets were coalesced and converted to glycogen, while no changes were observed in the mutant vestigial.
2. Degeneration of the cells by phagocytosis were observed not only from the mutant vestigial, but from the wild type. However, degenerative feature of the wild type was poor.
3. Dented structures of tracheole showed little differences between wild type and the mutant vestigial. But the tracheole diameter of the wild type became wider in the course of differentiation, while the mutant vestigial narrow.

Although mutant vestigial develops normally during early embryogenesis, the late third instar larvae shows deficiency in gluconeogenesis, converting fatty acid to glycogen. This, together with the predominant cell degeneration by phagocytosis and poorly developed tracheole, seems to effect on the expression of the vestigial phenotype.

서 론

노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)의 유충은 두 종류의 세포 즉 유충 시기를 지나 번데기 시기에 대부분 소실되는 세포들과 번데기 시기에 분화하여 성체의 구조를 형성하는 성체원기(imaginal disc)라는 독특한 세포군으로 구성되어 있다(Bodenstein, 1950). Silvert and Fristrom(1980)은 성체원기는 50개 정도의 배포피세포의 합물에 의해 생기며 유충시기에 세포분열을 하면서 그 크기가 증가하여 3령기 초기의 세포 수는 3령기 말기의 세포 수의 10~20%정도라고 보고하였다.

쌍시목 곤충에 있어서는 5종류(눈-촉수, 다리, 날개, 평균봉, 생식기)의 성체원기가 있으나 그 중에서 날개 성체원기는 40,000~60,000개의 세포로 이루어진 가장 큰 원기이다(Silvert and Fristrom, 1980).

Chen (1929), Auerbach (1936), Waddington (1939), Crew (1936), Kuroda (1958) 등은 광학현미경으로 날개분화에 대한 형태적 연구를 흔적날개 돌연변이체와 비교하여 실시했으며, Fristrom (1969;1970)은 날개 돌연변이체에서 세포의 퇴화현상을 투사진자현미경으로 관찰한 연구를 보고한 바 있다.

본 연구는 투사진자현미경을 이용하여 야생형과 흔적날개 돌연변이체의 날개 성체원기의 미세구조를 비교하여 흔적날개 표현형의 발현에 미치는 요인을 규명하고자 실시되었다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 재료

본 연구에 사용한 실험동물은 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)의 야생형인 Oregon-R과 흔적날개 돌연변이체(vestigial, *vg*)이었다. 이 초파리들은 25°C±1°C의 항온실에서 표준배지로 사육하였다.

야생형과 흔적날개 개체의 발생단계가 동일한 유충을 얻기 위하여 초파리 300개체 정도를 각각 표준배지에서 2시간 동안 산란시킨 후 성체는 모두 제거하였다.

야생형과 흔적날개 돌연변이체의 성숙된 날개 성체원기는 동일한 시기에 산란된 알로부터 발생된 제 3령기 유충에서 얻었다. 즉 야생형은 140시간, 150시간, 160시간, 190시간, 경과된 유충을, 흔적날개 개체는 140시간, 160시간, 180시간 경과된 유충을 초파리 Ringer 용액(Ephrussi and Beadle, 1936)으로 여러번 씻고 해부현미경 하에서 watch maker's forceps으로 날개 성체원기를 분리하였다.

2. 전자현미경적 관찰

분리해낸 날개 성체원기는 전자현미경 관찰을 위해서 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)로 만든 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 고정할 후 같은 완충용액으로 만든 1% O₃O₄에 다시 고정하였다. ethanol과 propylene oxide로 탈수시킨 후 Epon 혼합액(Epon 812; dodecenyl succinic anhydride, DDSA; methyl nodie anhidride, MNA; DMP-30)에 포매하였고, LKB-Huxley ultramicrotome을 사용하여 60~90nm의 초박편을 만든 후 uranyl acetate와 lead citrate의 이중염색으로 조직표본을 제작하였다. (Frasca and Parks, 1965; Reynolds,

1963; Venable and Coggeshall, 1964). 조직표본은 AEI Corinth 500 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 지방소적의 변화

지방소적은 막에 둘러싸여 있지않고, 직경이 1~2 μ m 정도의 타원형 또는 구형의 구조를 하고 있으며, 제 3령기 유충에서 분리한 날개원기 건반에 걸쳐 관찰되었다(Figs. 1, 2). 야생형의 경우 지방소적의 크기는 시간이 경과함에 따라서 거의 변화가 없었으나 그들은 wing proper를 이루고 있는 상피조직의 기저부로 이동하면서 서로 응집한 후 전자밀도가 조밀한 입자로 변화되는 양상이 관찰되었다(Fig. 1; Wehman, 1969). 이러한 현상은 Poodry and Schneiderman (1970)에 의해 야생형의 다리 성체원기에서도 보고 되었으며, 그들은 이러한 현상을 지방소적이 당류로 변화되는 과정이라고 기술하였다.

그러나 흔적날개의 경우는 시간이 경과함에 따라 지방소적들이 wing proper를 이루고 있는 상피조직의 기저부로 이동은 하지만 서로 응집하는 현상과 지방소적의 전자밀도가 조밀한 입자가 생기는 현상은 관찰되지 않았다(Fig. 2).

2. 세포의 퇴화

야생형과 흔적날개 돌연변이체의 날개 성체원기의 세포들은 wing proper와 peripodial membrane 사이에서 퇴화되는 것이 관찰되었다(Fig. 3). 이와같이 퇴화되어 가는 세포들은 식세포 작용에 의해 분해되는 현상으로 나타났는데, 그 과정이 흔적날개에서 관찰된 것은 Fristrom (1968, 1969)의 관찰 내용과 일치하나 야생형에서도 이러한 퇴화되는 세포들이 관찰되었다. 그러나 흔적날개의 경우 보다는 식세포 작용이 현저하게 약한 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

3. 기관세지의 형태

기관세지의 내벽은 톱니모양을 이루고 있으며 이러한 구조는 야생형과 흔적날개에서 거의 변화가 없었다. 그런데 야생형의 경우는 유충이 발달됨에 따라서 기관세지의 직경이 넓어지는 경향을 보이거나 흔적날개의 경우는 오히려 좁아지는 경향을 나타냈다(Fig. 5).

고 찰

곤충에 있어서 지방이 탄수화물로 변화되는 현상에 관한 연구는 광범위하게 실시되어 왔다. 누에(*Bombyx mori*)는 유충 말기에 먹이 섭취를 중단하는데 Wyatt(1967)는 이 때 glycogen의 양은 증가하고, 그와 동시에 지방의 양이 감소하는 현상을 발견하고 지방이 glycogen으로 변화된다고 보고하였으며, Stay(1959)는 blow-fly (*Phormia regina* Meigen)를 재료로 사용하여 조직화학적 방법으로 날개 성체원기는 glycogen을 함유하고 있으며 이들 glycogen은 유충 말기에 현저히 증가되고 그들의 대부분은 지방소적 내에 존재함을 관찰하였다.

노랑초파리 (*Drosophila melanogaster*)의 다리 성체원기에서도 전자 현미경으로 관찰한 바에 의하면 지방소적이 glycogen으로 변화되는 현상이 보고 되었다(Poodry and Schneiderman, 1970).

본 연구에서 사용된 노랑초파리 (*Oregon-R*)에서 유충 말기의 지방소적이 점차 커지고, 또 그들은 합쳐지며, 그 후 전자밀도가 높은 과립으로 되는 현상은 Wyatt (1967), Stay (1959) 및 Poodry and Schneiderman (1970) 등의 연구결과와 비교할 때 지방이 glycogen으로 변화되는 과정으로 생각된다. 그러나 흔적날개 돌연변이체에서는 이러한 gluconeogenesis 현상이 매우 약하며 거의 관찰되지 않았다. 그러므로 흔적날개 돌연변이는 이러한 gluconeogenesis 과정에 관여하는 어떤 효소가 결핍되었기 때문에 나타나는 것으로 생각된다. 최근 제 3령기 유충에서 성체원기를 다량으로 얻어내는 방법이 고안되었고 성체원기 내에서 tricarboxyl acid cycle에 관여하는 isocitrate dehydrogenase가 검출되었다 (Silvert and Fristrom, 1980).李와朴(1982)은 야생형과 흔적날개 돌연변이체의 날개 성체원기에 함유된 단백질을 조사한 결과 단백질 함량과 종류의 차이가 다소 존재한다고 밝혔다는데 이것은 효소의 기능과 관련된다고 볼 수 있다. 이와같이 날개 성체원기에 대한 광범한 효소학적 연구가 이루어지면 이 문제는 해명될 것으로 사료된다.

한편 Fristrom (1968)은 초파리 흔적날개 돌연변이체를 18°C~25°C와 30°C에서 각각 사육하면서 세포의 퇴화와 분해상태를 관찰하였는데, 18°C~25°C에서 사육한 개체에서는 퇴화되는 세포들이 상당수 관찰되었으나 30°C에서 사육한 경우는 날개가 돌연변이체 보다 커지고 퇴화하는 세포수도 감소한다고 보고 하였다. 또한 Kuroda (1958)는 초파리의 날개 돌연변이체인 *vg*, *vg^{no}*, 및 *vg^{nb}* 등의 3령기 유충으로부터 얻은 날개 성체원기를 배양하면서 날개성체원기의 발생을 비교한 연구에서 흔적날개의 성체원기를 31°C에서 배양하면 야생형의 성체원기 발생과 같은 결과를 얻었다. 따라서 Fristrom (1968)과 Kuroda (1958)에 의하여 고온처리와 세포의 퇴화현상과는 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

그러나 본 연구에서는 비록 그 빈도는 낮았으나 야생형의 성체원기에서도 퇴화되어 가는 세포들이 관찰되었다. 그러므로 세포가 퇴화되어 가는 현상은 흔적날개 돌연변이체에서만 나타나는 현상으로 생각할 수는 없으며 세포퇴화 현상이 흔적날개를 이루는 절대적 요인은 아닌듯 생각된다.

성체원기에 분포되어 있는 기관세지는 톱니모양의 구조를 나타내는데, 흔적날개 돌연변이체는 그 직경이 야생형에 미하여 좁아지는 경향이 나타났다. 날개 성체원기가 날개를 형성하는 과정에서 충분한 산소 공급이 필요한데, 위와같은 구조적 차이로 보아 흔적날개 돌연변이체는 산소 공급이 충분치 못하여 날개 형성에 영향을 주는 것 같다. 그러나 현재까지 기관세지와 성체원기의 발생에 관한 연구가 없었기 때문에 본 연구의 결과로서 확실한 결론은 내릴 수 없고 앞으로 추구해야 할 문제로 생각된다.

이상의 본 연구 결과를 종합해 볼 때 Kuroda (1958)가 3령기 유충에서 얻은 흔적날개 돌연변이체의 날개 성체원기를 고온 처리하여 야생형의 성체원기 발생과 같은 결과를 얻은 것으로 보아 흔적날개의 형질 발현은 3령기에서 나타나는 것으로 생각되며, 본 연구의 결과에서 3령기 말기에서 관찰된 gluconeogenesis의 결핍, 세포의 퇴화현상, 및 기관세지의 발달부진에 의한 산소 공급의 부족등 복합적인 요인과 관계있을 것으로 생각된다.

요 약

노랑초파리 (*Drosophila melanogaster*)의 야생형과 날개 돌연변이체인 흔적날개(*vg*)에 있

어서 날개 성체원기의 미세구조의 차이를 비교검토하여 흔적날개의 표현형이 발현되는 원인의 일단을 규명코저 본 연구를 실시하였다.

야생형과 흔적날개 개체의 제 3령기 말기의 유충으로 부터 10시간 간격으로 채취한 날개 성체원기에서 나타나는 미세구조의 변화를 비교 관찰하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 야생형의 경우 지방소적들은 응집한 후 당류로 변화되었지만 흔적날개의 경우는 응집 현상과 당류로 변화되는 과정이 관찰되지 않았다.

2. 식세포작용에 의한 세포의 퇴화현상은 흔적날개 변이체와 야생형에서도 관찰되었다. 그러나 야생형에서의 식세포작용은 매우 약하였다.

3. 기관세지의 내벽이 톱니모양의 구조를 나타내고 있는 것은 모두 비슷하였으나 기관세지의 직경은 야생형의 경우 시간이 경과함에 따라 넓어지는 경향을 보였으며, 흔적날개의 경우는 반대로 좁아지는 경향을 나타내었다.

이와같이 흔적날개 돌연변이체도 유충발생 초기까지는 모두 정상적으로 이루어지지만 제 3령기유충시기에 이르러서는 지방산이 당류로 변화되는 gluconogenesis 과정에서 결함이 보이고 식세포작용에 의한 세포의 퇴화현상이 현저했으며, 기관세지의 발달은 미흡한 점으로 보아 이와같은 현상들이 흔적날개 형성과 깊은 관계가 있는 것으로 사료된다.

REFERENCES

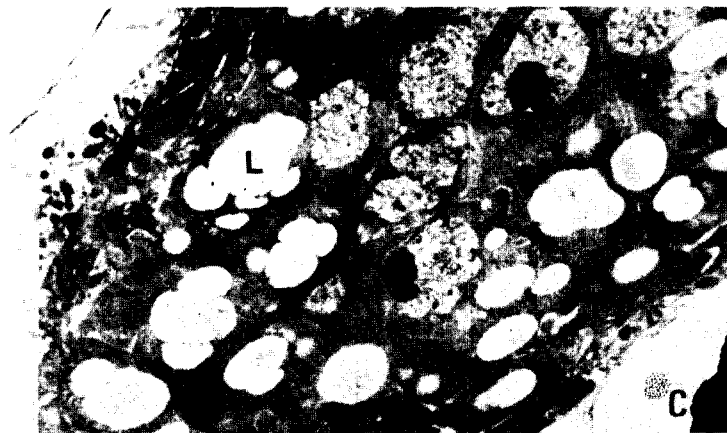
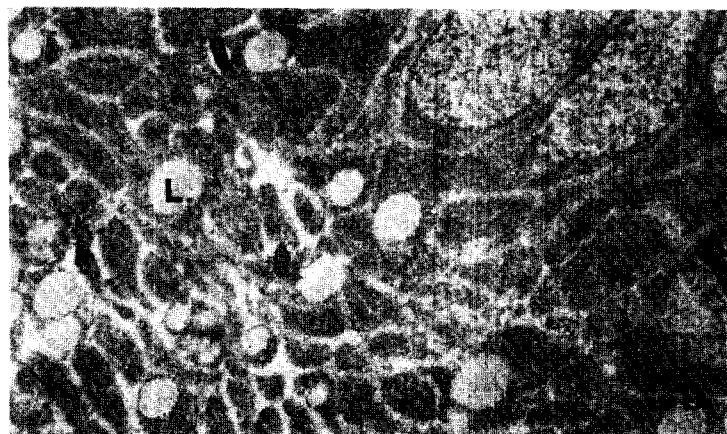
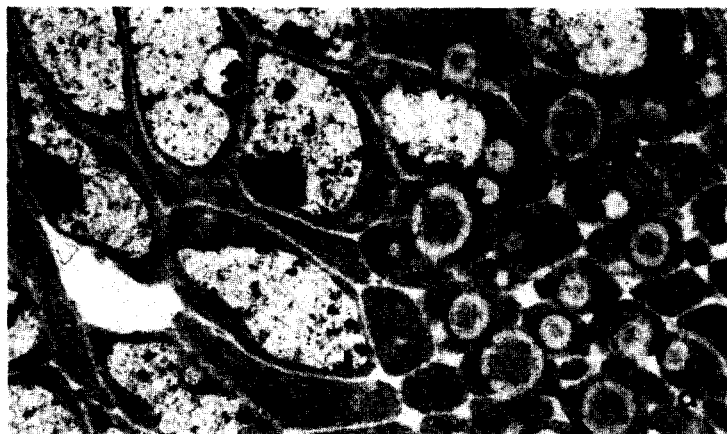
- Auerbach, C., 1936. The development of the legs, wings, and halteres in wild type and some mutant strains of *Drosophila melanogaster*. *Trans. Roy. Soc. Edin.* 58:787-815.
- Bodenstein, D., 1950. The postembryonic development of *Drosophila*. In: *Biology of Drosophila*. (ed. by M. Demerec), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp.257-363.
- Chen, T.Y., 1929. On the development of the imaginal buds in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 47:135-199.
- Crew, F.A.E., 1936. Developmental studies. *DIS* 5:24-25.
- Ephrussi, B. and G.W. Beedle, 1936. A technique of transplantation for *Drosophila*. *Amer. Naturalist* 70:218-225.
- Frasca, J.M. and V.R. Parks, 1965. A routine technique for double staining ultrathin sections using uranyl and lead salts. *J. Cell Biol.* 25:157-161.
- Fristrom, D., 1968. Cellular degeneration in wing development of the mutant vestigial of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 39:488-491.
- Fristrom, D., 1969. Cellular degeneration in the production of some mutant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Molec. Gen. Genetics* 103:363-379.
- Kuroda, Y., 1958. Comparative study of the wing discs of vestigial series in *D. melanogaster* in tissue culture. *DIS* 32:134-135.
- Lee, Y.R. and S. Park, 1982. Studies on the determination of the imaginal wing discs of *Drosophila melanogaster*. I. Protein synthesis in the wing discs of the normal and vestigial strains, *Korean J. Zool.* 25:93-106.
- Poodry, C.A. and H.A. Schneiderman, 1970. The ultrastructure of the developing legs of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux' Archiv.* 166:1-44.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron

- microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-212.
- Silvert, D.J. and J.W. Fristrom, 1980. Biochemistry of imaginal disc: Retrospect and prospect. *Insect Biochem.* 10:341-355.
- Stay, B., 1959. Histochemical studies on the blow-fly, *Phormia regina* Meigen. *J. Morph.* 105: 427-456.
- Venable, J.H. and R. Coggeshall, 1964. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25:407-408.
- Waddington, C.H., 1939. Preliminary note on the development of the wings in normal and mutant strains of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 25:299-307.
- Wehman, H.J., 1969. Fine structure of *Drosophila* wing imaginal disc during early stages of metamorphosis. *Wilhelm Roux' Archiv.* 163:375-390.
- Wyatt, G.R., 1967. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *In: Advances in insect physiology*, Vol. 4. (ed. by J.W.L. Beament *et al.*), Academic Press, New York.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1.** The lipid droplets seem to be coalescing and replaced by glycogen.
- 140 hrs old larvae of wild type ($\times 4,300$).
 - 150 hrs old larvae of wild type ($\times 4,300$).
 - 160 hrs old larvae of wild type ($\times 4,300$).
 - High magnification of (c) ($\times 11,500$).
 - 190 hrs old larvae of wild type. The lipid droplets seem to be replaced by glycogen ($\times 11,500$).
 - 190 hrs old larvae of wild type. The lipid droplets are completely replaced by clusters of glycogen ($\times 11,500$).
- L, lipid droplet; Gly, glycogen.
- Fig. 2.** The lipid droplets seem not to be converted to glycogen in vestigial strain.
- 140 hrs old larvae of vestigial strain ($\times 4,300$).
 - 160 hrs old larvae of vestigial strain ($\times 4,300$).
 - 180 hrs old larvae of vestigial strain ($\times 11,500$).
- L, lipid droplet.
- Fig. 3.** Degenerating cells in a vestigial strain.
- (a), (b) Many cells (arrows) in an advanced stage of degeneration ($\times 2,800$).
 - High magnification of degenerating cell ($\times 11,500$).
- PM, plasma membrane; N, nucleus; L, lipid droplet.
- Fig. 4.** Degenerating cell in a wild type.
- A cell is being engulfing by another cell ($\times 11,500$).
 - A cell in an advanced stage of degeneration ($\times 11,500$).
- PM, plasma membrane; N, nucleus.
- Fig. 5.** Change of tracheole diameter depend on the time and strain.
- 140 hrs old larvae of wild type ($\times 2,800$).
 - 160 hrs old larvae of wild type ($\times 1,400$).
 - 140 hrs old larvae of vestigial strain ($\times 1,400$).
 - 160 hrs old larvae of vestigial strain ($\times 2,800$).
- Tra, tracheole.

Fig. 1.



Continue
Fig. 1.

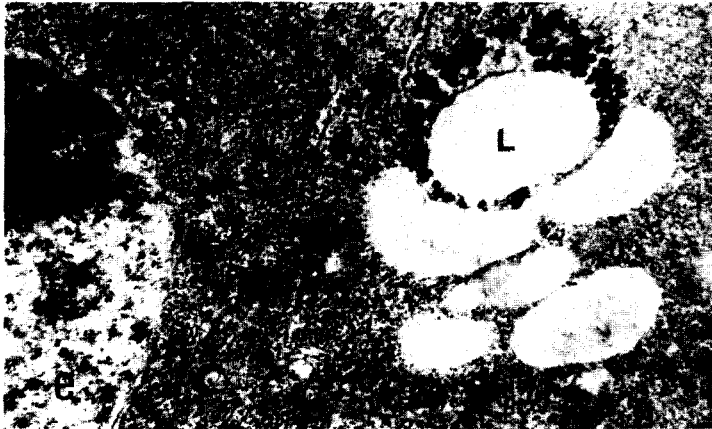
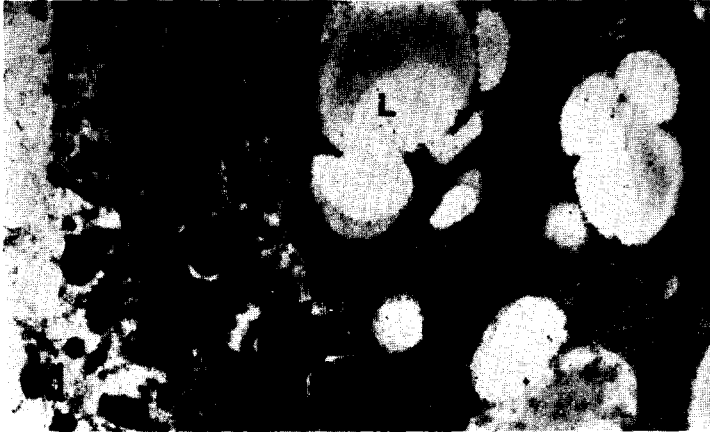


Fig. 2.

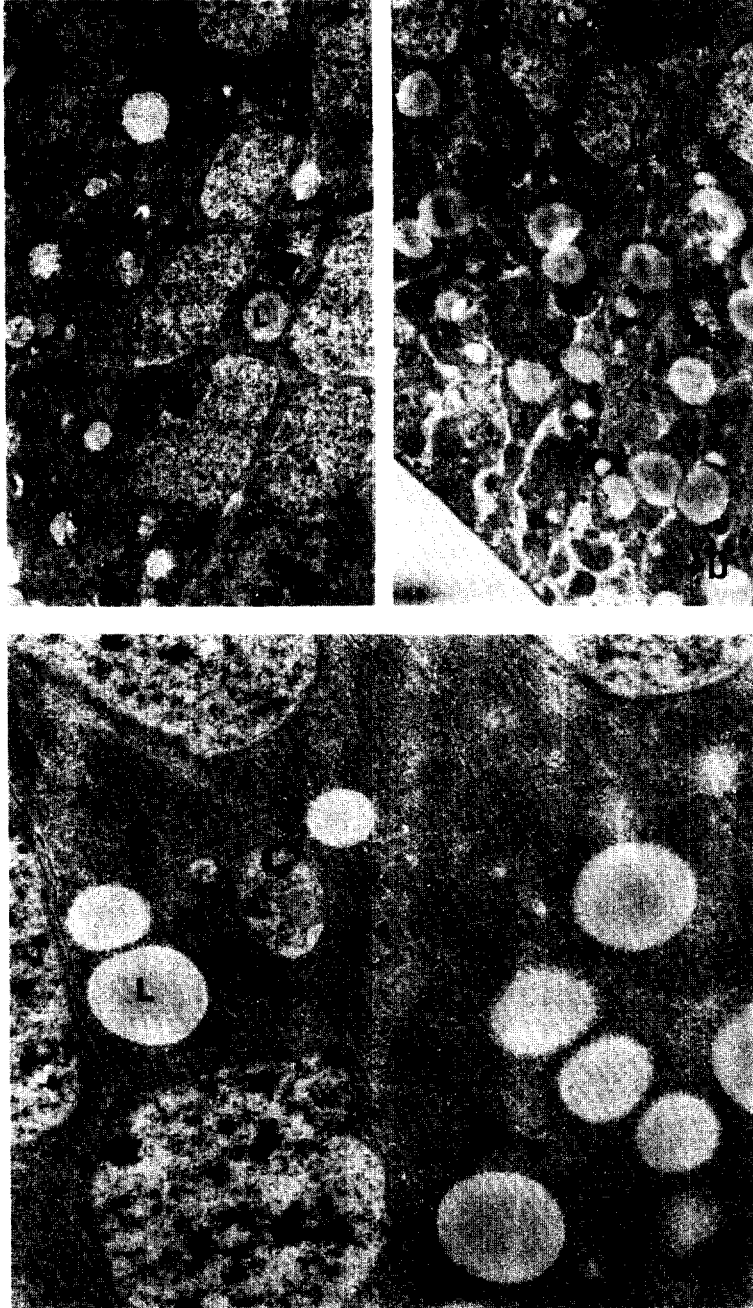


Fig. 3.

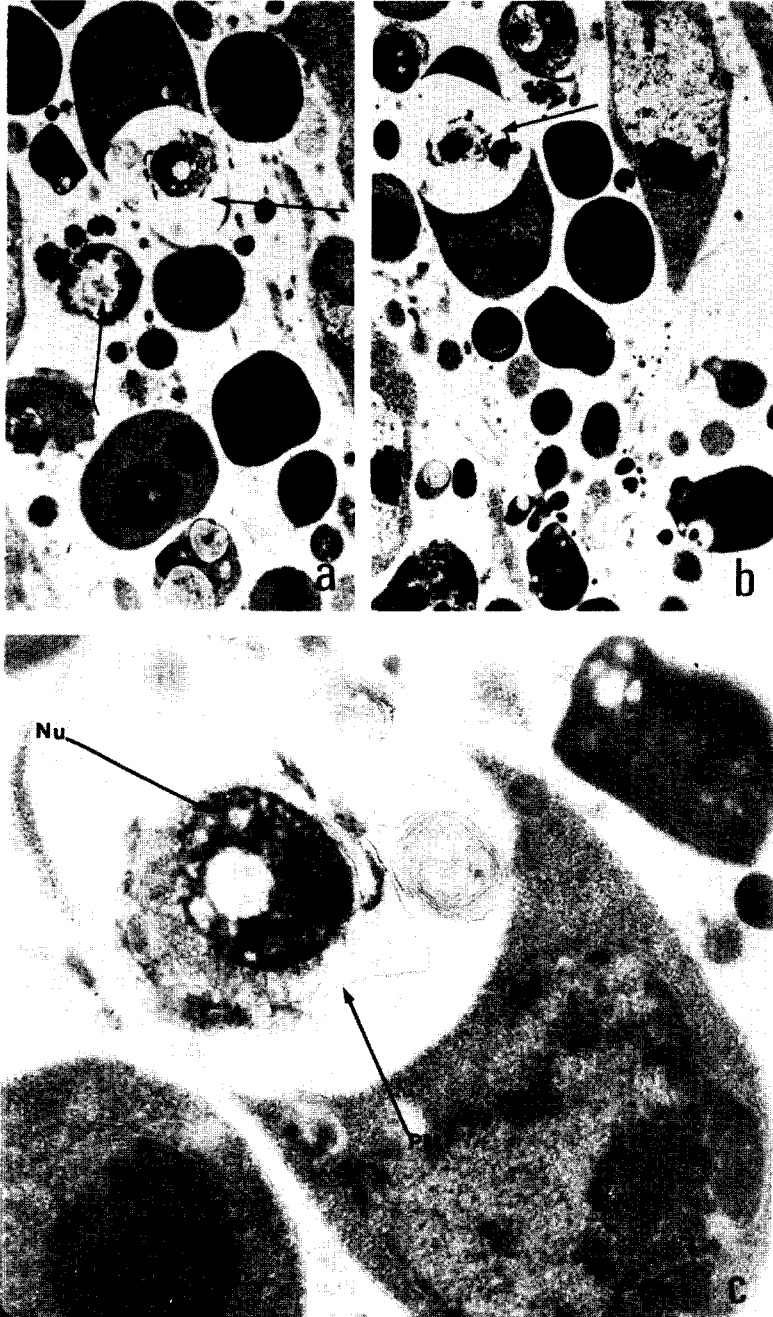


Fig. 4.

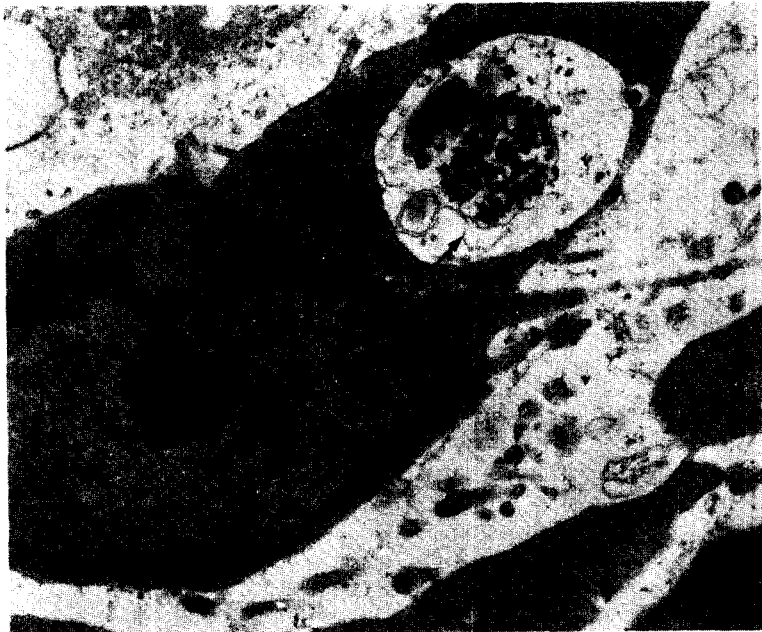
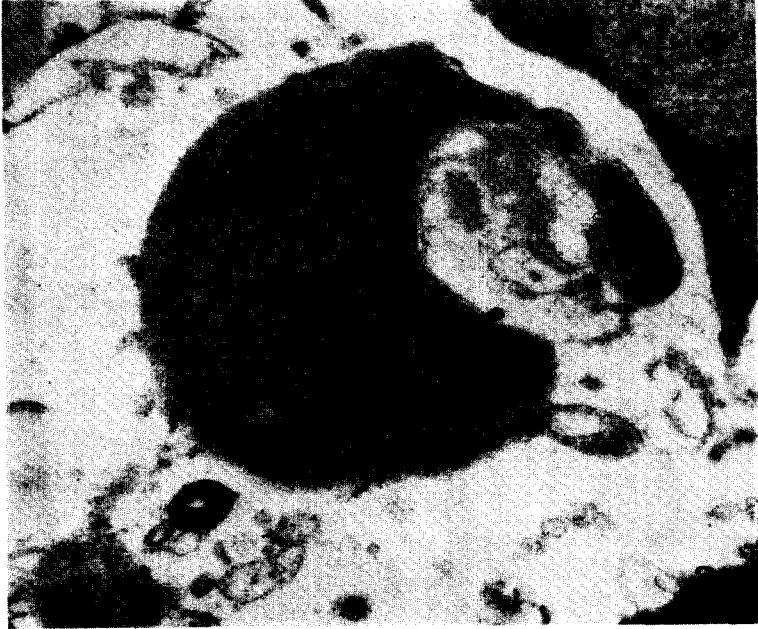


Fig. 5.

