

Streptanthus tortus 조직배양 세포에서 사부 영역과 사공의 형성

조봉희

수원대학교 자연과학대학 생명과학부

Formation of Sieve Element Area and Sieve Pore in Suspension Cultures of *Streptanthus tortus*

CHO, Bong-Heuy

Department of Life Science, the University of Suwon, Suwon, 445-890, Korea

ABSTRACT Sieve element area and sieve pore formed generally from plasmodesmata. Sieve pore formed by the fusion of several tiny vesicles with plasmodesmata, or those with cell wall after the destruction of special region of newly formed cell wall or those finally with circular arranged form from tissue culture of *Streptanthus*. The tiny vesicles were produced from dispersed nucleolus or heterochromatin. The sieve area and sieve pore formed from tissue cultured cells were shown round tube form similar to those of natural plants. Sieve area and sieve pore were produced by various methods, and it suggested that the basic materials of the construction of sieve pore originated from the vesicles.

Key words: Heterochromatin, phloem, plasmodesmata, sieve plate, sieve pore

서 론

식물에서 사부는 호르몬과 광합성 산물의 수송 및 수송된 물질들을 세포 내에 축적하고, 축적된 물질들을 식물체의 전 조직으로 수송하는 중요한 역할을 하는 부분이다. 식물체에서 사부는 원통형의 기관으로 되어 있고, 전형성층이나 유관속 형성층으로부터 형성된다 (Esau 1960). 미분화된 조직배양 세포는 전형성층과 유관속 형성층이 없으므로 사부를 형성할 수 없어, 식물성장 호르몬 등을 사용하여 사부의 분화를 유도시켰다 (Cho 1991). 일반적으로 미분화된 조직배양 세포로부터 유도된 사부와 사부의 기능은 식물체의 사부와 구조적으로 유사해야지 물질을 축적시키고 수송할 수 있을 것으로 추정하였으나 지금까지 미분화된 조직배양 세포로부터 유도된 사부는 식물체의 사부와 마찬가지로 원통형의 관모양을 하고 있는지에 대한 확실한 연구 결과는 없다.

미분화된 세포로부터 유도된 사부는 식물체에 존재하는 사부와 같은 기능을 지니고 있음을 순수 분리한 사부세포로 증명하였고, 사부세포 내로 설탕이 축적되는 메커니즘도 식물체에 존재하는 사부와 유사함을 보였다 (Cho 1998). 또한 순수 분리된 사부세포는 반세포 없이도 설탕을 축적시켜 (Cho 1998), 사부세포는 반세포가 반드시 있어야만이 설탕을 축적시킬 수 있다는 지금까지의 이론 (Giaquinta 1983)과도 다를 것을 증명하여 식물체에 존재하는 사부와 조직배양 세포에서 유도된 사부의 기능이 같음을 보였다 (Cho 1998).

조직배양 세포에서는 미분화된 유조직 세포가 불균등한 세포분열을 하여 사부와 반세포로 분화되었다 (Cho 1991). 미분화된 세포로부터 사부가 형성될 때 5~20개 이상의 세포가 동시에 한 덩어리로 사부를 형성하였다. 여러 개의 세포가 모여 사부를 형성하기 때문에 사부영역과 사공도 이 시기에 형성된다. 사공은 미분화된 원형질 연락사로부터 유래되었다 (Sjolund et al. 1983; Cho 1991). 그러나 사부영역과 사공이 형성되는 과정이나 사공의 구조에 대해서는 분명한 연구가 없었다. 따라서 본 연구에서는 사부 영역과 사공의 형성과정과 완전히 형성된 사공의 구조를 연구하고자 하였다.

*Corresponding author. Tel 031-220-2482 Fax 031-220-2452
E-mail bhcho@suwon.mail.ac.kr

재료 및 방법

재료 및 배양 조건

Petri dish에 여과지를 이중으로 깔고 멸균시킨 후 멸균된 증류수를 부었다. *Streptanthus tortus* 씨는 1% NaOCl로 10 분간 멸균한 후 멸균된 증류수로 3번 세척한 후 25°C 암소에서 5일간 발아시켰다 (Cho 1987). 발아된 유식물로부터 자엽을 분리시켜 5 mm 크기의 절편으로 자른 후 MS 기본배지에 (Murashige and Skoog 1962) 4 mg/L의 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)와 NAA (0.1 mg/L naphthaleic acid)가 함유된 배지를 이용하여 암소에서 캘러스를 유도시켰다. 유도된 캘러스 5 g을 MS 기본배지에 2 mg/L의 2,4-D, 0.1 mg/L NAA와 1 mg/L의 kinetin이 함유된 사부분화 액체 배양액에서 사부를 유도시켰다.

유조직 원형질체의 분리

액체 조직배양 유조직 세포 1 g을 0.4 µm filter를 이용하여 멸균된 0.7M sorbitol과 mannitol에서 1시간 동안 원형질 분리를 유도시켰다. 그 후 해리용 배지 (0.5 M sorbitol과 mannitol + 2 mM CaCl₂ + 0.5 mg/mL bovine serum albumin (BSA) + 5 mM (인산 나트륨 완충액, pH 6.0) 10 mL에 0.2% macerace (Cal Biochem.)와 0.03% cellulase (Cooper)를 첨가한 후 2시간 동안 세포벽을 해리시켰다. 시료를 2,500 rpm에서 15분간 원심분리시킨 후 부스러진 세포와 분리된 세포벽을 제거하였다. 원형질체는 효소만 제외된 해리용 배지로 3번 세척한 후 12% ficoll gradient를 이용하여 살아 있는 원형질체만 순수 분리하였다. 분리된 원형질체는 전자현미경 연구를 위하여 즉시 사용하였다.

사부세포의 분리

액체조직배양세포 1 g을 소독된 0.9 M sorbitol과 mannitol로 1시간 동안 전처리한 후 해리용 배지 (0.9 M sorbitol과 mannitol + 2 mM CaCl₂ + 0.5 mg/mL BSA + 5 mM 인산나트륨 완충액, pH 6.0) 10 mL에 0.2% macerace (Cal Biochem.) + 0.03% cellulase (Cooper) + 0.02% pectinase + Rohadmet (Rdehm GmbH)와 proteinase inhibitor로 2 µg/mL (soybean trypsin inhibitor type I-S + 10.6 µM Na-p-tosyl-L-arginine methyl ester + 5.8 µM Na-benzyl-L-arginine methyl ester + 0.8 µM leupeptin + 1.1 µM pepsin A)가 들어 있는 배지에서 3시간 해리시킨 다음 200 µm 나일론 망을 통과시켜서 망 위에 있는 해리되지 않은 세포들을 제거하였다. 망을 통과한 세포는 다시 70 µm 나일론 망을 통과시킨 후 효소가 제외된 해리용 용액으로 3번 세척하였다. 망 위에는 사부원형질체, 반세포원형질체와 사부와 목부가 함유되어 있었

다. 다시 150 µm 나일론 망을 통과시키면 망 위에는 사부와 목부 덩어리만 남고 원형질체는 망을 통과하게 된다. 망 위에 있는 사부는 효소가 제외된 해리용 용액으로 여러번 세척하여 모든 불순물을 제거시킨 후 전자현미경 연구를 위하여 고정되었다. 망을 통과한 원형질체 중에 30 µm을 통과하면 사부원형질체와 반세포원형질체가 분리되며, 12% ficoll gradient로 살아 있는 원형질체를 순수 분리한 후 전자현미경 연구를 위하여 고정되었다.

전자현미경적 방법

현탁 배양세포 1 g을 인산 완충액, pH 6.0으로 잘 세척한 후 5% glutar aldehyde로 2시간 고정하였다. 전처리된 원형질체와 사부원형질체는 효소가 제외된 해리용 용액에 5% glutar aldehyde 함유된 용액에서 2시간 고정시킨 후, 인산 나트륨 완충액 pH 6.0으로 5회 세척한 다음 2% OSO₄로 1시간 30분 고정하였고, 동일 완충액으로 3회, 증류수로 2회 세척하였다. 단, 원형질체는 삼투압을 단계적으로 낮추면서 세척하였다. 2% uranyl acetate로 30분 처리한 후 10% 아세톤 - 95% 아세톤의 농도 순으로 탈수시켰다. 100% 아세톤으로 3회 처리하여 완전히 탈수된 시료를 Spurr's plastic으로 포말한 후 다이아몬드 칼로 10 µm 크기로 잘랐다. 염색은 uranylacetate와 lead citrate로 이중염색하였다 (Cho 1989).

결과 및 고찰

사부영역과 사공의 형성

사부에 존재하는 사부영역 (sieve element area)과 사공 (sieve pore)은 원래 두 개의 유조직 세포의 세포벽과 세포벽을 연결하는 원형질 연락사에서 유래되는 것으로 알려져 있다 (Sjolund et al. 1983; Cho 1991). 원형질 연락사에서 가지를 친 소포체 소관 (desmotubule)형태로 사공이 형성되어 사부세포와 반세포가 연결된다 (Cho 1998). 사부영역에는 유조직 세포벽에 이미 존재하던 원형질 연락사로부터 사공이 형성되거나 (Cho 1991), 유조직 세포로부터 사부가 유도되는 과정에서 유조직 세포의 세포벽 안쪽으로 새로 세포벽이 합성될 때 원형질 연락사가 사라지는데 (Cho 1991), 이처럼 원형질 연락사가 없는 세포벽에서도 사공이 형성되었다 (Figure 1).

사부가 유도되고 있는 사부영역에는 수많은 작은 소포체들이 밀집되어 있었고, 이 소포체들이 사공을 형성하였다. 사공은 원래 존재하던 원형질 연락사의 막이 융합되면서 형성된다고 하였으나 (Sjolund et al. 1983), 본실험에서는 사부 세포질 (세포벽이 없는 장소)에 있는 소포체들이 여러 개 원형질로 모여서 서로 막이 융합되면서 형성되어 (Figure 1), 지금까지 사공의 형성에 대한 보고들과는 차이를 보여주었다. 또한

소포체들은 미분화된 세포에서 사부로 분화되면서 새로 형성되었던 세포벽의 특정한 장소를 분해시키면서 사공을 형성하여 (Figure 1), 소포체 안에는 세포벽을 분해시키는 효소가 들어 있을 것으로 추정된다. 분해된 세포벽은 소포체 내에 있는 효소와 사공조립 재료들에 의하여 사공이 조립되어 둥근 모양 또는 타원형에 완전한 사공을 형성하였다.

소포체들은 핵이 분해되어 세포질에 산재되어 있는 인과 이질염색질로부터 sieve element reticulum (SER)과 사부 단백질이 합성되는 것처럼 형성되고 (Cho 1991) 있음을 관찰할 수 있었다 (Figure 1). 핵이 사라진 후 어떻게 세포질에 산재되어 있는 인과 이질염색질에서 구조 단백질, 효소와 소포체들이 합성될 수 있는지 의문이다. 다만 추측할 수 있는 것은 미분화된 세포에서 사부세포로 분화되기 직전에 구조 단백질들과 효소들을 합성하는 데 필요한 모든 RNA와 재료들이 준비되어 있거나 또는 필요한 효소들이 이미 합성되어 불활성인 상태로 남아 있다가 어느 시기에 활성화되도록 준비되어 있을 것으로 추정된다. 핵이 분해되면서 세포질에 산재된

인과 이질염색질들은 리보솜, SER, p-protein과 소포체들을 합성하면 사라졌다. 그 증거는 이들 구조들을 합성하고 있는 자리에는 인과 이질염색질이 보였고, 이 구조들이 합성된 자리에서는 인과 이질염색질은 보이지 않았거나 희미한 흔적만이 남아 있었기 때문이다. 이미 형성되고 있는 사공 주위에는 SER이 조밀하게 존재하고 있었다.

이처럼 사공이 원래 존재하던 원형질 연락사로부터 형성되는 것 외에 (Cho 1991), 사공을 합성하는 재료가 인과 이질염색질에서 만들어져서 소포체 형태로 사부영역 주위에 밀집된 후 세포벽이 없는 장소에서도 소포체의 융합으로 새로운 사공이 형성되었고, 새로 합성된 세포벽을 분해시킨 후 소포체와 융합되면서 사공이 형성되었던 것과 원래에 존재하던 원형질 연락사에 소포체가 융합되면서 사공이 형성된 것은 처음 보고되는 일이다. 소포체 안에는 어떤 물질이 합성되어 저장되어 있는지는 알 수 없지만 아마도 사공을 만드는 단백질과 그에 관련된 효소들일 것으로 추정된다.

새로 형성된 사공은 원통모양을 하고 있음을 분명히 보여주고 있었다 (Figure 2). 세포벽 가장자리 영역에서는 원통모양인 사공의 원형모양의 관을 관찰할 수 있었고 (Figure 2), 분화 중에 있는 SER를 사공주변에서 관찰할 수 있었다. 조직배양 세포에서 유도된 사공이 원형모양을 이루고 있는 경우는 아직까지도 보고되지 않은 일이다. 사부 안에 존재하는 amyloplast에는 많은 전분이 축적되어 있어 핵이 사라진 후 필요한 에너지를 제공해 주는 장소 중에 하나일 것으로 추정된다.

순수 분리된 사부의 분석

분화된 조직배양 세포에서 유조직 세포를 제거하고 유관속만 추출하여 사부와 사공의 형태를 보았다 (Figure 3). 사부는

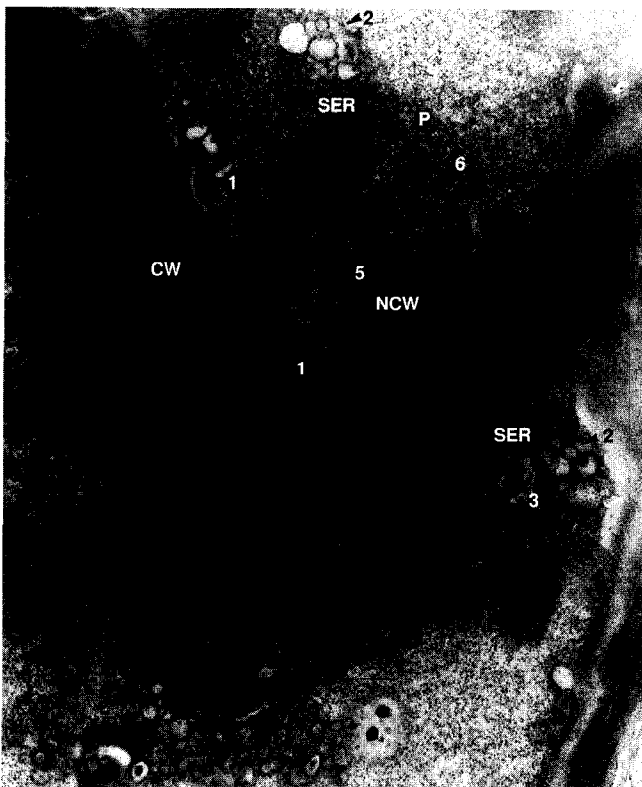


Figure 1. Phloem cells of 10 days after culture. Two phloem cells separated by a cell wall (CW) and new cell wall (NCW). In the around of sieve element area numerous small vesicles were detected, which formed sieve pore through fusion with plasmodesmata (arrow 1) or fusion without plasmadesmata (arrow 2) and new sieve pore was formed by fusing of tiny vesicles with round arranged form (arrow 3) or by fusing of vesicles and cell wall after the destruction of special region of newly formed cell wall (arrow 4). p-protein (P), sieve element reticulum (SER) and ER were produced by dispersed heterochromatin in the cytoplasm. The small vesicles were also produced from hetrochomatin (arrow 6). Bar = 0.865 μm

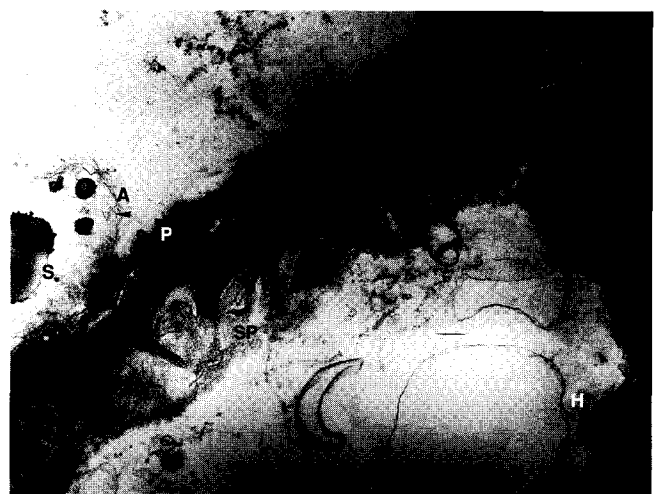


Figure 2. Sieve pore (SP) of 10 days culture. The shape of sieve pore was shown in a round tuber form (arrow). Starch grain (S) accumulated in the amyloplast (A). p-protein and SER developed gradually from heterochromatin (H). SER were shown on the edges of cell wall or cytoplasm. Bar = 0.444 μm

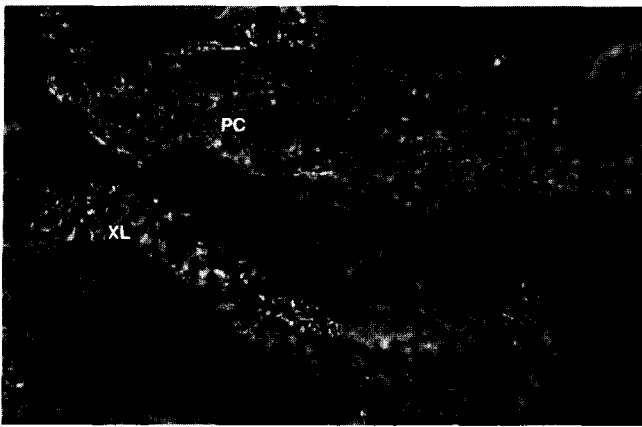


Figure 3. Isolated vascular system of 10 days after culture. Phloem consisted of several cells. Several xylem (XL) were existed in the around of the cluster of phloem (PC). Bar = 0.25 μ m



Figure 4. Isolated early phloem cells of 10 days after culture. Two phloem cells connected with sieve pore (arrow) in the middle of two cells. The oval or round forms of mitochondria (M) aggregated together at many places, and heterochromatins (H) were accumulated dense form in the nuclear membrane fragment. Starch was not shown in the chloroplast (C). In the large vesicles with tonoplast (T) were accumulated dense unknown materials. Small vesicles and big protein bodies were shown at many places. Bar = 0.78 μ m

여러 개의 세포로 구성되어 있었고, 사부 주위에는 많은 목부가 밀집되어 있어서 일반 식물체와 매우 유사함을 보여 주었다. 2개의 사부세포 원형질체가 사판으로 연결되어 있었고 (Figure 4) 두 세포 사이에는 사공이 있었다. 아직 완전히 소화되지 않은 사공영역이 있었고, 어린 사부세포 안에는 미토

콘드리아의 모양이 등근 형태로 서로 밀집되어 있었고, 형태적으로 변한 미토콘드리아는 사부세포가 계속 성숙되는 데 필요한 에너지를 제공한다고 추정된다. 두 개의 사부세포 사이에는 사부영역이 길게 늘어져 있었고, 사공영역은 일반 식물체 같은 모양을 하고 있음을 보여 주었다.

적 요

사부에서 사부영역 또는 사공은 원형질 연락사로부터 형성된다. 사공의 형성은 원형질 연락사에 작은 소포체의 융합 또는 새로 형성된 세포벽의 특정한 장소가 먼저 분해된 후 소포체와 세포벽의 융합으로 형성되었거나, 또는 세포질에서 여러개의 작은 소포체들이 원형으로 모여 서로 융합되면서 형성되었다. 소포체들은 세포 내에 산재해 있는 인이나 이질염색질에서 합성되었다. 조직배양 세포로부터 유도된 사부나 사공은 일반 식물체에 존재하는 사부와 마찬가지로 원통모양이었다. 사공이 다양한 방법으로 형성되며, 사공형성에 필요한 재료는 소포체에서 유래되는 것으로 추정된다.

인용문헌

- Cho BH (1987) Analysis of the two affinity system of the uptake of fructose in suspension culture cells. *Korean J Bot* 30:277-285
- Cho BH (1989) The specific basic amino acid transport system in suspension culture cells. *Korean J Plant Tissue Culture* 16:195-202
- Cho BH (1991) Structural consideration of the translocation and the mechanism of phloem loading of *Streptanthus* cells in suspension culture. *Korean J Plant Tissue Culture* 19:89-93
- Cho BH (1998) Isolation of phloem cells and active transport of sucrose by isolated phloem and parenchyma cells of *Streptanthus tortuosus* suspension cultures. *Korean J Plant Tissue Culture* 25:7-11
- Esau K (1960) Phloem. In : Esau K, (eds), *Anatomy of Seed Plants*, Ed2, John Wiley and Sons, New York, pp. 157-180
- Giaquinta KT (1983) Phloem loading of sucrose. *Annu Rev Plant Physiol* 34:347-387
- Murashige T, Skoog E (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Sjolund RD, Shih CY, Jensen KG (1983) Freeze-fracture analysis of phloem structure in plant tissues. III p-protein sieve area pores, and wounding. *J Ultrastruct Res* 82:98-211