

HVEM에 의한 둥근잎평의비름 (*Sedum rotundifolium* L.) 색소체의 결정체 구조

김 인 선
계명대학교 자연과학대학 생물학과

High Voltage Electron Microscopy of Structural Patterns of Plastid Crystalline Bodies in *Sedum rotundifolium*

InSun Kim

Biology Department, College of Natural Sciences, Keimyung University,
Daegu 704-701, Korea

(Received April 23, 2006; Accepted May 25, 2006)

ABSTRACT

Major contributions has been made in cellular ultrastructure studies with the use of high voltage electron microscopy (HVEM) and tomography. Applications of HVEM, accompanied by appropriate image processing, have provided great improvements in the analysis of three-dimensional cellular structures. In the present study, structural patterns of the crystalline bodies that are distinguished in mesophyll plastids of CAM-performing *Sedum rotundifolium* L., have been investigated using HVEM and tomography. Tilting, and diffraction pattern analysis were performed during the investigation. The titling was performed at $\pm 60^\circ$ with 2° increments while examining serial sections ranging from 0.125 to 1 μm in thickness. The young plastids exhibited crystalline inclusion bodies that revealed a peculiar structural pattern. They were irregular in shape and also variable in size. Their structural attributes affected the plastid morphology. The body consisted of a large number of tubular elements, often reaching up to several thousand in number. The tubular elements typically aggregated to form a cluster. The elements demonstrated either a parallel or lattice arrangement depending on the sectioning angle. The distance between the elements was approximately 20 nm as demonstrated by the diffraction analysis. HVEM examination of the serial sections revealed an occasional fusion or branching of elements within the inclusion bodies. Finally, a three-dimensional reconstruction of the plastid crystalline bodies has been attempted using two different image processing methods.

Key words : Crystalline bodies, HVEM, Plastids, *Sedum rotundifolium*, Three-dimensional reconstruction, Tubular elements

This work was supported in part by a Korea Research Foundation Grant (KRF-2003-070-C00037). The author thanks Dr. Tatsuo Arai of NIPS at Okazaki National Institutes of Natural Sciences for the collaboration of the current work.

* Correspondence should be addressed to Dr. InSun Kim, Biology Department, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea. Ph.: (053) 580-5305, FAX: (053) 580-5305, E-mail: botany@kmu.ac.kr

서 론

세포 및 세포내 미세소기관들의 구조 연구에서 수 마이크로미터 두께의 후박절편까지도 연구할 수 있는 초고압전자현미경 (HVEM)을 이용하면 100 nm 미만의 얇은 시료만 관찰 가능한 투과전자현미경 (TEM) 연구에서보다 훨씬 많은 구조적 정보를 얻어낼 수 있다. 이는 1 MV 이상의 초고압에너지에 의한 투과성 및 해상도 증대에 기인한 것으로 두꺼운 생체시료는 물론 거대분자의 관찰 및 분석도 가능하게 된다 (Hama, 1989). 더 나아가 HVEM을 이용하여 얻은 결과에 Ducky, Imod, OSR, 또는 Stereon 등 적절한 이미지 처리기법 (image processing software, Hessler et al., 1996; Kremer et al., 1996; Marko & Leith, 1996; Winkler & Taylor, 1996; Pittet et al., 1999)을 실시하면 기존의 TEM에서보다 훨씬 향상된 이미지 결과 및 분석으로 심도 있는 구조적 정보를 알아낼 수 있다. 이러한 방법을 시도하여 색다른 결과를 도출해 낸 연구들은 생체시료의 3차원적 입체구조 분석의 bioimage 영역에서 주목받고 있으며, 일부는 핵심적인 역할을 하고 있다 (Smith et al., 1997; Mannella et al., 2001; Otegui et al., 2001; Frank et al., 2002; Katsuna et al., 2003; Segui-Simarro et al., 2004; Otegui & Staehelin, 2004; Verma & Hong, 2005).

색소체 (plastid)는 식물세포에 발달하는 매우 중요한 세포소기관으로 광합성뿐만 아니라 여러 가지 대사과정을 수행하는 매우 중요한 세포소기관이다. 내·외막의 이중막으로 둘러싸인 색소체는 광합성의 명반응이 일어나는 틸라코이드 막성계 (thylakoid membrane system)와 액체성 구획인 기질 (stroma)로 분화된다. 기질에는 DNA, 리보솜 및 각종 효소가 포함되어 있으며 (McDonald, 2003), 광합성의 암반응인 캘빈 회로가 일어나는 중심부이다. CAM대사 (Crassulacean acid metabolism)를 수행하는 일부 식물에서는 생장단계상 또는 일주기성 (diurnal fluctuation) 현상으로 색소체 기질에 결정상의 구조를 형성하기도 한다 (Salema & Brandao, 1978; Santos & Salema, 1981, 1983; Ryberg et al., 1993; Kim 1997). 이들 결정체는 단백질성 전구물질로 된 구조로서 일부 식물이 제한된 조건

에 적응하여 CAM대사를 수행할 때 필요한 효소를 저장하여 공급해주는 부위라 추정되고 있다 (Santos & Salema, 1983; Kim 1997). 여러 CAM식물의 다육질성 엽육조직의 색소체에 이러한 결정구조들이 보고 되어 있지만 (Kim, 1997), 이들에 대한 구조적 특성과 기능에 대하여는 아직까지 자세히 연구되어 있지 않다.

생물·의학 분야에서 HVEM을 통한 수 μm 이상의 후박절편 연구 및 수합된 이미지 결과를 이용하여 3차원적인 입체구조로 분석하면 보다 많은 세포생물학적 정보를 얻어낼 수 있다. 그러나 HVEM이 지닌 이러한 장점에도 불구하고 지금까지 우리나라에서의 활용과 연구는 아직 국외의 상황에 미치지 못하고 있는 실정이다. 특히, 식물세포의 핵심적 기능이라 할 수 있는 광합성을 수행하는 엽록체 등 색소체에 대한 3차원적 입체구조 연구는 거의 시도된 바 없다. 이에 본 연구에서는 CAM대사를 수행하는 *Sedum rotundifolium*의 엽육세포 색소체에 일시적으로 발달하는 결정체에 대하여 결정구조 및 그 구성 초미세요소들의 특성을 먼저 HVEM으로 연구하고 수합된 결과에 대해 후속적인 image processing을 시도하여 그 구조를 밝혀보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 투과전자현미경 (TEM) 연구

등근잎평의비름의 어린 엽육조직을 2~5 mm 크기로 절단하여 3% glutaraldehyde 용액으로 실온에서 3시간 전고정한 후 2% OsO_4 로 4°C에서 2시간 동안 후고정하였다. 각각의 고정 후에는 0.1 M sodium phosphate buffer로 3회 세척하였다. 후고정된 시료는 acetone 탈수과정을 거쳐 low-viscosity Spurr resin으로 포매되었고, resin block은 Reichert Ultracut-S ultramicrotome 상에서 glass knife로 0.5~1.0 μm 두께의 절편으로 제작되어 결정체 분포 확인실험에 사용되었다. 확인과정을 거친 block들은 diamond knife에 의해 60~90 nm의 초박절편으로 제작되었고, chloroform fume 처리하여 compression이 최소화된 후 formvar 피막을 입힌 grids로 옮겨졌다. 이후 2% uranyl acetate (45분)와 lead citrate (10~30분)로 이중염색되어 한국

기초과학지원연구원 대구센터 소재의 Hitachi H-7100 투과전자현미경을 이용하여 75 kV에서 조사되었다.

2. 초고압전자현미경 (HVEM) 연구

화학고정 시료와 함께 극저온고정 (cryofixation) 후 동결치환법으로 처리된 시료가 HVEM으로 조사되었다. 시료는 plunge법과 동결치환장치에 의한 프로그램에 의해 일련의 과정을 거쳐 resin block으로 포매되었는데 그 과정은 다음과 같다. 먼저 어린 엽육조직을 2 mm² 미만으로 잘라 plunge 방법에 의해 극저온으로 고정 (Leica EM MM80E)시켰다. 극저온고정법 등의 급속동결기법은 현재까지 생물시료를 고정하여 artifact를 최소화하는 가장 효과적인 방법으로 잘 알려져 있다 (Gilky & Staehelin, 1986; Giddings, 2003). 이와 같은 극저온고정 실시 후 신속하게 specimen을 액체질소에 옮겨 Auto Freeze Substitution System 장치 (Leica EM AFS)에서 동결치환 (freeze substitution)을 수행하였다. 동결치환은 -80°C, -30°C, 0°C에서 2% OsO₄ (OsO₄ in 100% acetone)를 각각 8시간씩 처리한 후 실온에서 무수 아세톤으로 3회 반복 교체하였다. 이후 Epon 812 혼합액으로 포매하여 60°C 건조기에서 48시간동안 중합 (polymerization) 처리하였다. AFS 방법과 함께 2~4% glutaldehyde 및 2% OsO₄의 화학고정에 의한 시료제작이 병행되어 고정방법에 따른 색소체내 결정 구조의 미세구조를 비교 조사하였다.

연속절편제작 (Serial sectioning)-2×1 mm 크기의 single hole grid에 formvar coating (0.35% formvar in chloroform)을 실시하고 약 10 nm 두께의 탄소피막 (carbon coating)을 입힌 후 사용하였다. 연속적으로 제작된 semi-thick section (0.125~0.25 μm), 또는 후박절편 (thick sections, 0.5~1.0 μm)을 각각 순차적으로 그 리드에 올렸다. 이들에 대한 uranyl acetate와 lead citrate 이중염색에서는 통상의 염색에서보다 높은 농도와 온도, 긴 염색시간 (3~6% uranyl acetate in 70% methanol, 60°C warm plate 또는 건조기내 2~4시간)으로 실험되었으며, 염색 후 HVEM에 의해 관찰될 때까지 desiccator에 보관되었다. 이후 대부분의 그리드는 다시 탄소피막 처리되었는데, 이러한 과정을 거치면 그리드 위의 절편들이 안정화되어 HVEM 이용 시 기

기 및 시료가 contamination 될 가능성이 매우 적게 된다.

회절분석 (Diffraction analysis) 및 HVEM 연구-결정 체내 초미세 관상 요소들에 대한 회절패턴은 optical diffractometer를 이용하여 TEM 또는 HVEM에 의한 결정구조 사진 (electron micrographs)에 적용하여 결과를 도출하였다. HVEM에 의한 구조연구는 일본 오카자키 국립생리학 연구소 (National Institute for Physiological Sciences, NIPS) 소재 생물·의학 전용 초고압 전자현미경 (Hitachi 1250-M, 1 MV)을 사용하였다. 이에 의해 얻어진 연속절편상의 결과는 Artix Scan 4500t Microtek와 Mitsubishi CP9500DW에 의한 디지털화 과정을 거쳐 Imod 및 3-D Max를 통한 image processing으로 3차원적인 입체구조로 재구현되었다.

결 과

CAM대사를 하는 다육질성 *Sedum rotundifolium* 엽육조직의 초박절편에서 먼저 TEM으로 색소체 기질에 발달하는 결정체의 개략적인 분포가 조사되었고 (Fig. 1), 이후 이들에 대해 제작된 0.125~1 μm에 이르는 두께별 연속절편들을 HVEM으로 연구하였다. 일반적인 화학고정 방법과 극저온고정 및 동결치환법을 거친 시료의 엽육조직 색소체 내에는 모두 결정체가 형성되어 있었다. 후자의 방법에 의해서는 *Sedum* 엽육세포 액포에 저장되어 있는 다량의 수분에 의해 동결고정 시 세포가 팽창되어 세포벽이 함몰되거나 미토콘드리아 및 색소체 등의 세포소기관들이 팽창되는 구조적 변형이 심하게 일어났다. 그러나, 색소체내 기질에 형성되는 결정체는 결정구조의 주변부위 (marginal area)에 있는 일부 관상요소들의 격자간 거리가 증가되었으나 결정체 중심 및 인접한 부위의 격자구조는 화학고정법에 의한 결정체내 관상요소들의 격자간 거리와 큰 차이가 없이 비교적 잘 보존된 상태로 관찰되었다. HVEM에서 획득된 색소체 기질에 발달하는 결정체 및 이를 구성하는 초미세 관상요소 (tubular elements)의 구조와 배열양상 등을 중점적으로 분석한 결과 조사된 이들의 구조적 특징은 다음과 같다.

약 1~2 mm 내외의 미성숙 엽육조직에서 이미 분

화 초기단계에 결정체가 형성되었다. 색소체 내에는 4~5 μm 에 이르는 커다란 결정체들이 분포하였는데 (Fig. 2), 이들은 일반적으로 틸라코이드 막성체 사이에 분산되어 발달하였다. 일부 색소체의 경우, 이들 결정구조는 색소체의 외부기질 (peripheral stroma)에 크게 형성되기도 하였다. 초미세 관상요소들의 회절패턴 (diffraction pattern)은 결정체가 형성하는 격자구조 (Fig. 3) 또는 평행구조 (Fig. 4)에 대한 diffractogram 분석으로 확인하였다. 회절패턴 분석에 의하면 이들 결정체 내에는 약 20 nm 이하의 격자간격으로 이루어진 수백 또는 수천 개 이상의 미세한 관상의 요소들이 무리지어 발달하며, 매우 규칙적으로 배열되어 있기 때문에 어느 관상요소를 기준으로 하여도 6개의 관상요소가 둘러싸는 육방정계 (hexagonal arrangement)를 이루는 정교한 구조가 되었다. 이들 결정체의 형성은 틸라코이드 막성체 발달에 앞서 진행되었는데, 색소체 내에는 이러한 결정체가 하나 이상 발달하는 경우도 흔히 관찰되었다 (Fig. 5). 잘 발달한 성숙한 색소체에 실시한 연속절편에 의한 입체구조 연구에 의하면 하나의 절편에서 여러 개의 작은 결정구조로 분산되어 나타나는 일부 결정체들은 해당 절편의 이전 또는 이후의 절편들에서는 융합된 구조로 관찰되었다. 즉, 결정체의 일부분이 국부적으로 분리되거나 혹은 말단부위 등이 분지한 결과 여러 개로 형성된 것처럼 단편적인 2-D 결과 (single sectioned image)로 나타난 것이다.

결정체내 초미세구조들은 시료 제작시 section angle에 따라 또는 HVEM 상에서 일정한 각도로 tilting 함에 따라 상이한 배열양상을 보였다. $+5^\circ$ 와 -5° 에서의 stereo view (Fig. 6)에서는 물론, 이들을 일정한 각도 ($\pm 2^\circ$, $\pm 6^\circ$, $\pm 8^\circ$)로 tilting하여 얻은 연속 이미지에서도 동일 결정체 내에서 구성요소들이 격자구조 (crystalline lattice)를 이루거나 평행구조 (paralleled structure)로 나타났다. 이들 초미세 관상요소들은 막으로 둘러싸이지 않으며 일정한 형태를 이루지 않는 불규칙적인 구조로 발달하였다. 특히, 초기단계의 색소체에서는 전관상체 (prolamellar body) 및 녹말입자 (starch grain)와 인접하며 발달하여 이들 구조간의 기능적 연관성이 추정되었다. 이들 색소체가 발달하여 엽록체가 되면 결정구조는 완전히 사라지는 특성을

보였다. 이렇게 얻어진 색소체내 결정구조 결과에 대하여 image processing을 실시한 3차원적 입체구조 결과는 Fig. 7과 8에 재구현 되었다.

고 찰

세포 또는 세포내 소기관의 3차원적 입체구조의 구현에는 연속절편으로부터의 image를 이용하는 방법과 tilted image를 이용하는 방법이 있다. 연속절편 이용 방법은 각각의 image들을 쌓아서 입체구조를 구현하는 방법으로 image 수합 후, 정렬 (image alignment)과 윤곽선 추출과정 (contour rendering)을 통해 규명하고자 하는 세포나 세포내 소기관을 입체구조로 구현한다 (Koster et al., 1997). Tilted image를 입체구조로 표현하는 방법은 일반적인 TEM 연구방법과는 달리 같은 시료를 -60° 에서 $+60^\circ$ 까지 일정한 각도로 기울여가며 촬영된 연속적인 image를 수합한다. 대부분의 경우 시료는 2° 간격으로 기울여지며 image 정보가 획득된 후 영상 정렬을 거쳐 3차원적 입체구조로 표현된다. 절편의 두께가 두꺼울수록 생체 시료의 심도 있는 구조정보를 얻어낼 수 있으므로 이 방법을 위해서는 두꺼운 시료 절편을 투과할 수 있는 HVEM을 사용해야 된다. 획득된 2-D 정보는 적절한 image processing을 거친 다음 optical section 되어 새로운 serial image로 수합되어 규명하고자 하는 세포 또는 세포내 소기관의 3차원적 입체구조가 재구성된다 (Kremer et al., 1996; Koster et al., 1997).

색소체는 광합성에서의 역할뿐만 아니라 세포내에서 여러 대사과정을 동시에 수행하는 기능적으로 복잡한 세포내 소기관이다. 또한 매우 역동적이어서 분열, 분화, 발달하여 특수한 물질대사와 구조를 갖는 여러 형태로 변화한다 (Ryberg et al., 1993; McDonald, 2003; Waters & Pyke, 2005). 특히 CAM대사를 수행하는 일부 종에서는 생장단계상 또는 일주기성 현상으로 색소체 기질에 결정상의 구조체를 형성한다 (Salema & Brandao, 1978; Santos & Salema, 1981, 1983; Ryberg et al., 1993; Kim, 1997). 이들이 색소체 내에서 발달하는 초미세구조에 대한 입체구조 연구는 아직 수행된 바 없다. 반면, 식물세포내 중력감지체 (Smith et al.,

1997), 액포 (Saito et al., 2002; Katsuna et al., 2003), 세포분열 (Otegui et al., 2001; Segui-Simarro et al., 2004; Otegui & Staehelin, 2004), 세포막의 역동성 (Verma & Hong, 2005) 등 특정 소기관 연구에서 세포체제 (Haseloff, 2003)에 대한 연구에 이르기까지 3차원적 입체구조 연구는 활발하게 수행되어 오고 있다.

본 연구에서는 엽육세포 색소체 기질에 일시적으로 커다란 결정상의 구조를 발달시키는 둥근잎꿩의비름 (*Sedum rotundifolium*)을 HVEM을 이용하여 두꺼운 후박절편에 대한 tilting을 실시하여 각도에 따라 상이한 image들이 나타나는 것을 발견하였다. 이들을 일정한 각도($\pm 2^\circ$ 또는 $\pm 5^\circ$)로 tilting하여 얻은 이미지를 stereo viewer를 통하여 관찰하면 결정구조에 인접한 막성계 및 기질과 인접하는 다른 초미세구조들 사이의 입체적인 정보를 얻을 수 있음에 착안하여, tilted image와 연속 초박절편 및 후박절편을 이용한 HVEM 연구에 중점을 두었다. 이후 TEM 및 HVEM으로 관찰하여 수합된 연속절편들의 2-D image를 image processing 과정을 거쳐 3차원으로 재구성하여 입체적으로 분석함으로써 CAM대사 수행 색소체내 결정체를 구성하는 초미세구조의 형성 및 특성을 규명하고자 하였다.

앞에서 언급되었던 것처럼, 다육질성 CAM식물의 엽육세포에서 일시적으로 나타나는 결정구조의 특성 및 CAM대사 수행과정에서의 변화, 녹말입자 또는 전관상체와의 연관관계 등에 대한 구조적 측면에서의 연구가 자세히 이루어지지 않고 있다. 광학현미경 및 저배율의 TEM을 이용한 색소체 구조연구에서는 이들의 분포 및 위치 등은 확인할 수 있으나, 이들 결정체들이 접하고 있는 색소체내 여러 막성계 및 녹말입자 등과의 공간적 정보 (spatial relation)에 대해서는 배율이 비교적 높은 TEM을 이용하더라도 자세히 알아낼 수 없다. 향후 결정체를 구성하는 초미세구조들의 특성을 입체적으로 분석함으로써 색소체 결정구조와 틸라코이드 막성계, 녹말입자와의 구조적 상호연계성 등을 조사할 예정이다. 이와 함께, 엽육세포와 인접하고 있는 포피세포의 경우에도 색소체 내부에 결정체가 다른 양상으로 발달하는 것으로 선행연구에서 조사된 바 있다. 그러나 이들이 엽육세포 색소체에서와 같이 초미세의 관상요소로 구성되어 있는지 또는 인접하고

있는 틸라코이드 막성계로부터 기원하는지를 알아내기 위하여 포피세포 색소체에 대한 HVEM 연구를 계속 진행하고 있다.

참 고 문 헌

- Frank J, Wagenknecht T, McEwen BF, Marko M, Hsieh C, Mannella CA: Three-dimensional imaging of biological complexity. *J Struct Biol* 138 : 85-91, 2002.
- Giddings, TH: Freeze-substitution protocols for improved visualization of membranes in high-pressure frozen samples. *J Microsc* 212, 53-61, 2003.
- Gilky JC, Staehelin LA: Advances in ultra-rapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure. *J Electron Microsc Tech* 3 : 177-210, 1986.
- Hama K: Biological application of high voltage electron microscopy. *J Electron Microsc* 38 Suppl 156-162, 1989.
- Haseloff J: Old botanical techniques for new microscopes. *Biotechniques* 34 : 1174-1182, 2003.
- Hessler D, Young SJ, Ellisman MH: A flexible environment for the visualization of three-dimensional biological structures. *J Struct Biol* 116 : 113-119, 1996.
- Katsuna N, Kumagai F, Sato MH, Hasezawa S: Three-dimensional reconstruction of tubular structure of vacuolar membrane throughout mitosis in living tobacco cells. *Plant Cell Physiol* 44 : 1045-1054, 2003.
- Kim I: Chloroplast microtules in young leaves of *Sedum rotundifolium*. *J Plant Biol* 40 : 115-119, 1997.
- Koster AJ, Grimm R, Typke D, Heherl R, Stoschck A, Walz J, Baumeister W: Perspectives of molecular and cellular electron microscopy. *J Struct Biol* 120 : 276-308, 1997.
- Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR: Computer visualization of the three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 116 : 71-76, 1996.
- Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC, Moraru II, Slepcheko B, Loew LM, Hsieh, Buttle K, Marko M: Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *Life* 52 : 93-100, 2001.
- Marko M, Leith A: Stereoc three-dimensional reconstructions from stereoscopic contouring. *J Struct Biol* 116 : 93-98, 1996.
- McDonald MS: Photobiology of Higher Plant. Wiley, Chi-

- chester, pp. 148-198, 2003.
- Otegui MS, Mastronarde DN, Kang BH, Bednarek SY, Staehelin LA: Three-dimensional analysis of syncytial-type cell plates during endosperm cellularization visualized by high resolution electron microscopy. *Plant Cell* 13 : 2033-2051, 2001.
- Otegui MS, Staehelin LA: Electron tomographic analysis of post-meiotic cytokinesis during pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218 : 501-515, 2004.
- Pitte J, Henn C, Andreas A, Heymann JB: Visualizing 3D data obtained from microscopy on the internet. *J Struct Biol* 125 : 123-132, 1999.
- Ryberg H, Ryberg M, Sundqvist C: Plastid ultrastructure and development. In: Sundqvist C, Ryberg M, eds, *Pigment-Protein Complexes in Plastids: Synthesis and Assembly*, pp. 25-62, Academic Press, San Diego, 1993.
- Saito C, Ueda T, Abe H, Wada Y, Kuroiwa T, Hisada A, Furuya M Nakank A: A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant J* 29 : 245-255, 2002.
- Salem R, Brandao I: Development of microtubules in chloroplasts of two halophytes forced to follow Crassulacean acid metabolism. *J Ultrastruct Res* 62 : 132-136, 1978.
- Santos I, Salemma R: Chloroplast microtubules in some CAM plants. *Bol Soc Brot Ser* 2, 53 : 1115-1122, 1981.
- Santos I, Salemma R: Stereological study of the variation of chloroplast tubules and volume in the CAM plant *Sedum telephium*. *Z Pflanzenphysiol* 113 : 29-37, 1983.
- Segui-Shimarro JM, Austin JR, White EA, Staehelin LA: Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *Plant Cell* 16 : 836-856, 2004.
- Smith JD, Todd P, Staehelin LA: Modulation of statolith mass and growing in white clover (*Trifolium repens*) grown in 1-g, microgravity and on the clinostat. *Plant J* 12 : 1361-1373, 1997.
- Verma DPS, Hong Z: The ins and outs in membrane dynamics: tubulation and vesiculation. *Trends Pl Sci* 10 : 159-165, 2005.
- Waters M, Pyke K: Plastid development and differentiation. In: Moller SG, ed, *Plastids*, pp. 30-59, Blackwell Publishing, Oxford, 2005.
- Winkler H, Taylor KA: Software for 3-D reconstruction from images of oblique sections through 3-D crystals. *J Struct Biol* 116 : 241-247, 1996.

< 국문 초록 >

둥근잎평의비름 (*Sedum rotundifolium* L.) 엽육조직에 대한 초박절편 및 연속 후박절편의 시료를 제작하여 TEM 및 HVEM 고압전자현미경으로 연구하였고, 이로부터 수합된 색소체 결정체 구조의 tilting 및 연속절편 결과에 image processing을 실시하여 세포수준에서의 초미세구조 정보를 추출 3-D 입체구조로 재구현하였다. $\pm 60^\circ$ 에서의 tilting과 0.125~1 μm 에 이르는 연속절편에서 결정체를 구성하는 미세한 관상요소(tubular elements)의 구조적 특성을 조사한 결과, 결정체는 일시적으로 분화 초기단계에서 형성되어 4~5 μm 에 이르기까지 크게 여러 형태로 발달하나, 엽육조직이 성숙하면 이들 구조는 색소체에서 완전히 사라지는 특성을 보였다. 결정체를 구성하는 관상의 요소는 절단각도에 따라 격자구조 또는 평행 구조를 이루었으며, 이들 구조 내에 형성되어 있는 정교한 구조적 pattern은 회절분석에 의해 확인되었다. 결정체 내에는 규칙적으로 약 20 nm의 격자간격으로 이루어진 초미세관상의 요소들이 수백-수천 개 무리지어 발달하였다. 색소체 내에는 이러한 결정체가 하나 이상 형성되기도 하며, 일부 결정체의 경우 결정구조의 말단부위가 국소적으로 융합 또는 분지되기도 하였다. 결정구조는 막으로 둘러싸이지는 않으나, 대부분 틸라코이드 막성계와 밀착하여 발달하였다. 일차적으로 수집된 HVEM 상의 2-D 결과는 디지털화 과정을 거친 후 Imod와 3-D Max를 이용하여 3-D 입체구조로 재구현되었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Low magnification of mesophyll cells, showing plastids with inclusion bodies (arrowheads). is=intercellular space, v=vacuole. TEM. Bar=5 μm .
- Fig. 2.** Higher magnification of part of plastids with crystalline inclusion bodies (cr). s=starch. TEM. Bar=1 μm .
- Fig. 3.** Transversely sectioned inclusion body demonstrating crystalline structures (cr) obtained from the cryofixed material. HVEM. Bar=0.1 μm . Inset (left): Optical diffraction pattern of Fig. 3. Inset (right): Closeup of the crystalline structure exhibiting tubular elements in a highly consistent pattern. HVEM. Bar=50 nm.
- Fig. 4.** A large inclusion body developing in a plastid in parallel fashion. TEM. Bar=0.3 μm . Inset: Part of the paralleled inclusion body examined by HVEM. t=thylakoid. Bar=0.1 μm .
- Fig. 5.** Six small inclusion bodies scattered throughout a single plastid. Each number with an arrowhead corresponds to the same inset number on the bottom left and upper right corners. HVEM. Bar=0.5 μm . Inset 1-6: Except for inset 3, magnifications of all other insets are identical to that of Fig. 1. s=starch grain. HVEM. Bar=100 nm.
- Fig. 6.** Stereo view of the crystalline body taken at +5° (a) and -5° (b). A transversely sectioned inclusion body (arrowhead) demonstrating tubular elements with varying arrangements. s=starch grain. HVEM. Bar=50 nm.
- Fig. 7.** 3-D reconstruction of the plastid with inclusion body using Imod. cr=crystalline inclusion body, p=plastid. Compare with Fig. 8.
- Fig. 8.** 3-D reconstruction of the plastid with inclusion body using 3-D Max. Inset: 3-D model of tubular elements taken from the crystalline inclusion bodies (arrowheads).





