한국전자현미경학회지 제 36 권 제 3 호 2006
Korean J. Electron Microscopy 36(3), 217~226(2006)

초고압전자현미경에 의한 엽육세포 색소체 미세구조의 3차원적 분석

김인선*, 박상찬[1], 한성식[1], 김은수[2]
계명대학교 자연과학대학 생물학과, [1]고려대학교 생명과학대학 생명과학부,
[2]건국대학교 이과대학 생명과학과

Three-Dimensional Analysis of the Mesophyll Plastids Using Ultra High Voltage Electron Microscopy

InSun Kim*, Sang-Chan Park[1], Sung-Sik Han[1] and Eun-Soo Kim[2]
Biology Department, College of Natural Sciences, Keimyung University,
[1]College of Life Sciences and Biotechnology, Division of Life Sciences, Korea University,
[2]Department of Biological Sciences, College of Science, Kunkuk University
(Received August 23, 2006; Accepted September 8, 2006)

ABSTRACT

Image processing by ultra high voltage electron microscopy (UHVEM) and tomography has offered major contributions to research in the field of cellular ultrastructure. Furthermore, such advancements also have enabled the improved analysis of three-dimensional cellular structures in botany. In the present study, using UHVEM and tomography, we attempted to reconstruct the three-dimensional images of plastid inclusions that probably differentiate during photosynthesis. The foliar tissues were studied primarily with the TEM and further examined with UHVEM. The spatial relationship between tubular elements and the thylakoidal membrane and/or starch grains within plastids mainly have been investigated in CAM-performing *Sedum* as well as in C_4 *Salsola* species. The inclusion bodies were found to occur only in early development in the former, while they were found only in mesophyll cells in the latter. The specimens were tilted every two degrees to obtain two-dimensional images with UHVEM and subsequently comparison has been made between the two types. Digital image processing was performed on the elements of the inclusion body using tilting, tomography, and IMOD program to generate and reconstruct three-dimensional images on the cellular level. In *Sedum* plastids, the inclusion bodies consisted of tubular elements exhibiting about 20 nm distance between elements. However, in *Salsola*, plastid inclusion bodies demonstrated quite different element structure, displaying pattern, and origin relative to those of the *Sedum*. The inclusion bodies had an integrative relationship with the starch grains in both species.

Key words : CAM *Sedum*, C_4 *Salsola*, Mesophyll, Plastid inclusions, Three-dimensional analysis, UHVEM

This work was supported by a Korea Research Foundation Grant (KRF-2003-070-C00037). The authors thanks Drs. Kiyoshi Hama and Tatsuo Arii of NIPS at Okazaki National Institutes of Natural Sciences for the collaboration of the present study.
*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

광합성 및 여러 물질대사에 관여하는 색소체(plastid)는 식물세포에 발달하는 매우 중요한 세포소기관으로 구조 및 기능적 특성에 따라 전색소체(proplastid), 엽록체 (chloroplast), 유색체 (chromoplast), 황변체 (etioplast), 전분체 (amyloplast), 백색체 (leucoplast) 등으로 구별된다 (Gunning & Steer, 1996). 내막과 외막의 이중막으로 둘러싸인 색소체는 명반응이 일어나는 틸라코이드 및 그라나 막성계와 암반응이 일어나는 액체성 구획인 기질 (stroma)로 분화하여 (Ryberg et al., 1993; Sage & Monson, 1999; McDonald, 2003) 각각의 기능을 수행한다.

CAM 광합성 (Crassulacean acid metabolism)을 수행하는 *Sedum*속 식물 엽육세포의 색소체 기질에는 생장단계 또는 일주기성에 따라 결정상의 구조가 형성된다 (Santos & Salemma, 1983; Kim, 1997; Kim, 2006a, b). 이들 결정구조체는 단백질성 전구물질로 된 구조로서 일부 식물이 제한된 조건에 적응하여 CAM 대사를 수행할 때 필요한 효소를 저장하여 공급해주는 부위라 추정되고 있다 (Salemma & Brandao, 1978; Santos & Salemma, 1981; Santos & Salemma, 1983; Ryberg et al., 1993; Kim, 2006b). 여러 다육질성 CAM 식물의 엽육조직 색소체에 이러한 결정체들이 보고되어 있지만 (Kim, 1997), 이들 결정체 및 색소체내 다른 미세구조들과의 연계성에 대해서는 입체적으로 자세히 연구되어 있지 않다. 따라서 다육질성 CAM 식물 엽육조직에 일시적으로 나타나는 결정체를 이루는 구성요소 및 인접하는 티라코이드 막성계와 녹말입자 등과의 구조적 특성 등이 연구될 필요가 있다. 또한, *Salsola*속과 같은 C_4식물에서는 광합성 엽육조직이 유관속초세포 및 엽육세포의 형태로 분화되어 광합성 시 각기 다른 고유의 기능을 수행한다 (Kim & Fisher, 1990; Sage & Monson, 1999; Pyankov et al., 2001; Voznesenskaya et al., 2003). *Salsola* 식물 색소체내 결정구조는 특히 엽육세포에만 발달하여 유관속초세포의 색소체와는 매우 다른 구조적 특징을 보이는 것으로 조사된 바 있다 (unpublished data). 최근 *Sedum rotundifolium* 색소체내 결정체에 대한 연구에서 다양한 section angle에 따라 구성요소들의 배열양상이 상이하게 나타나는 현상이 보고 된 바 있고 (Kim, 2006a, b), *S. komarovii*의 엽육조직에서도 유사한 양상이 TEM 연구에 의한 1차 조사에서 확인되어 이들에 대한 3차원적 입체구조 연구는 이들 결정체의 기원 및 구조적 특성을 연구하는데 필수적이라 사료되었다. 이에 본 연구에서는 다육질성의 엽육조직을 지니며 CAM 광합성을 수행하는 *S. rotundifolium*과 C_4 광합성을 수행하는 *S. komarovii* 엽육조직 색소체에 발달하는 초미세구조의 특성을 TEM 및 UHVEM을 이용하여 밝혀 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 식물 재료

한국산 특산식물로 경상북도 청송군 주왕산 (Lee, 1996)에 서식하는 *Sedum rotundifolium*을 채집하여 실험실로 옮긴 후 생육상태가 양호한 약 10 mm 길이의 잎을 TEM 및 UHVEM 연구를 위한 시료로 사용하였다. 종자로부터 발아하여 생육된 *Salsola komarovii*에서는 약 10～15 mm 길이의 건강한 잎의 중앙부위 (median area)를 실험에 사용하였다.

2. UHVEM 시료 제작

가장 효과적인 세포고정법으로 알려진 high pressure freezing (HPF) 방법 (Gilky & Staehelin, 1986; Giddings, 2003)으로 고정한 시료는 Auto freeze substitution system 장치에 의한 프로그램에 의하여 치환 (substitution) → 포매 (embedding) → 중합 (polymerization) 과정을 거쳐 resin block으로 포매 제작되었다. HPF 방법과 함께 2～4% glutaldehyde 및 1% aqueous osmium tetroxide를 이용한 화학고정에 의한 전자현미경적 시료 제작도 병행되었다. 먼저, 4～6 mm^2 엽육조직을 채취하여 30% dextran (non-penetrating cryoprotectant; 178,000 MW; Sigma, St Louis, MO)에 넣고 1% (in pure chloroform) lecitin으로 coating하여 high pressure freezer (BAL-TEC AG, Liechtenstein)로 고정하였다. HPF 실시 후 신속하게 액체질소에 옮겨 freezing

substitution을 수행하였다. Freeze substitution은 −80도, −30도, 0도에서 2% osmium tetroxide (OsO_4 in 100% acetone)를 각각 8시간씩 처리한 후 실온에서 pure acetone으로 3회 반복 세척하였다. 이 후 Spurr resin 혼합액으로 포매하여 건조기에서 중합(60도, 72시간) 처리하였다.

절편제작에 앞서 formvar coating (0.35% formvar solution in chloroform)으로 2 × 1 mm single hole copper grids를 피막 처리하여 연속적으로 제작된 초박절편 (60 ~ 90 nm), semi-thin section (125 ~ 250 nm) 또는 후박절편 (thick sections, 0.5 ~ 1.0 μm)을 순차적으로 올렸다. 상기 제작된 grids 및 연속절편에 약 10 nm 두께의 carbon coating을 다시 처리하여 grid 상의 절편들이 안정화되어 UHVEM 이용 시 기기 및 시료가 contamination되지 않도록 준비하였다. 이후 높은 농도, 온도, 시간 (3 ~ 6% uranyl acetate in 70% methane, 60도 warm plate 또는 건조기내 2시간)으로 uranyl acetate와 lead citrate에 의한 이중염색을 실시하였다. 염색된 grids는 재차 carbon coating되어 UHVEM로 연구될 때까지 grid storage box에 넣어 desiccator에 보관하였다.

3. 3-D 입체구조 만들기

Electron tomography는 세포와 세포소기관의 3-D 입체구조를 구현하는 방법으로 연속절편으로부터 획득된 영상을 이용하는 방법과 tilted image를 이용하는 방법이 있다 (Reiner, 1996; Mastronarde, 1997; Frank et al., 2002). 연속절편을 이용하는 방법은 각각의 영상들을 쌓아서 입체구조를 구현하는 방법으로 이미지 획득 후, 영상의 정렬, 윤곽선 추출의 과정을 통해서 세포 또는 세포소기관의 구조를 보여준다. Tilted image로부터 입체구조를 구현하는 방법을 이용하기 위해서는 영상 수합에 있어 이전의 일반적인 TEM과는 다른 방법을 이용해야 한다. 일반적으로 −60도에서 +60도까지 2도 간격으로 같은 시료를 기울여 영상을 획득한 후 정렬을 거쳐 3차원적으로 재구성한다. 가용한 시료의 두께는 전자현미경의 가속전압에 의해 결정되므로, 이 방법을 위해서 가속전압이 1 MV 이상인 UHVEM이 사용된다. 이 방법은 시료의 영상을 weighted back-projection algorithm을 통해 optical section된 영상을 얻을 수 있게 하여, serial image reconstruction과 연결되어 한 시료 내에 있는 구조를 앞의 방법과 같이 3차원적 입체로 보여준다 (Gilbert, 2002). 각각의 image들은 Microtek ArtixScan 4500t에 의하여 디지털화 된 후, IMOD 프로그램 (Image Modelling of Display, Kremer, 1996)을 거쳐 분석되었다.

결 과

제작된 semi-thin 연속절편과 연속 후박절편을 TEM과 UHVEM으로 연구하여 2-D image를 획득한 후 이들 결과에 3-D electron tomography를 실시하였다. 이로부터 획득한 CAM 및 C_4 색소체 결정체 구성 초미세요소들의 image data로부터 구성요소들의 형성과 구조와 기능간의 관계를 연구하였다. CAM 색소체 결정체를 구성하는 미세소관성 요소 (tubular elements)와 C_4 색소체 결정체 형성에 관여하는 요소들의 특성은 다음과 같다.

1. *Sedum rotundifolium* 색소체 결정체

Sedum rotundifolium 엽육세포 색소체 내에는 수 μm 크기에 이르는 결정체들이 형성되어 색소체 용적의 큰 부분을 차지하는 초미세구조로 발달하였다. 일부 색소체에서는 기질에 분산되어 여러 개의 작은 결정구조로 관찰되기도 하였으나 연속절편 연구에서 많은 경우 이들은 실제로 하나의 커다란 결정체가 일시적으로 분리되거나 분지한 결과임이 확인되었다. 이들 초미세구조들은 시료 제작시 section angle에 따라 또는 UHVEM 상에서 일정한 각도로 tilting 함에 따라 상이한 image의 구조들로 나타났다. 이들을 ±2도, ±5도, ±6도 등 일정한 각도로 tilting하면 동일한 결정체 내에서도 이들 구성요소들이 격자구조 (paracrystalline structure)를 이루거나 평행구조 (paralleled structure)를 형성하는 것을 쉽게 볼 수 있다 (Fig. 1). 결정체 내에는 약 20 nm 격자거리로 이루어진 수백-수천 개의 기원을 알 수 없는 미세소관성 요소들 (tubular elements)이 무리지어 발달하며, 규칙적으로

배열되어 매우 정교한 구조를 이루었다(Figs. 1, 2A-2B). 색소체 내에는 이러한 결정체가 하나 이상 발달하는 경우도 흔히 관찰되었으나, 연속절편 연구 및 3-D 입체구조 분석에 의하면 여러 개로 분리되어 형성되어 있는 결정체들은 많은 경우 융합하여 하나의 결정체를 이루는 것으로 나타났다(Fig. 2C). 이들 미세소관성 요소들은 막으로 둘러싸이지 않으며, 특히 분화 초기의 어린 색소체에서는 전판상체와 녹말입자와 연관되어 분포하였다. 엽육조직이 성숙 발달하여 후기 엽록체 단계에 이르면 결정체를 비롯한 녹말입자, 전판상체는 엽육세포에서 완전히 사라지고 틸라코이드와 지질 입자가 발달하는 색소체로 변환되었다.

2. *Salsola komarovii* 색소체 결정체

C_4 광합성을 수행하는 식물체의 엽육조직에서와 같이 *Salsola komarovii* 엽육조직에서도 관속을 포위하는 유관속초세포(bundle sheath cell)를 엽육세포(mesophyll cell)가 동심원적으로 둘러싸는 크란츠구조(Kranz structure)를 이루고 있다. 각각의 세포에는 형태 및 내부 미세구조가 매우 다른 이형색소체들(dimorphic plastids)이 분포하였다. 유관속초세포는 엽육세포와 직접 접하고 있음에도 불구하고 색소체내 결정구조는 엽육세포에서만 형성되었으며, 이들 결정체는 CAM 광합성을 수행하는 *Sedum rotundifolium*의 색소체와는 달리 1 μm 미만으로 비교적 작게 분화하였다. *Salsola* 결정체는 거의 대부분 색소체 기질에 분포하는 티라코이드 막성계 및 녹말입자와 연계되어 발달하였고 (Figs. 3A-3B), 이러한 결정체와 녹말입자와의 밀접한 관계는 3-D 입체구조에서도 잘 나타나 있다(Fig. 3C). 때로는 일부 결정체들이 분리되어 2개로 관찰되기도 하나 이들 또한 연속절편으로 연구하면 하나의 결정구조로 합쳐지는 경우로 확인되었다. 한편, 결정체를 구성하는 요소들은 *Sedum* 색소체에서와는 달리 인접한 틸라코이드 막성계와 밀접한 관계 (spatial relationship)를 보이며 발달하였다(Fig. 4). 이들 구조 내에는 결정체를 구성하는 미세요소들이 비교적 규칙적인 양상을 보여 티라코이드와 평행하는 방향으로 배열하며 신장하였다(Figs. 3A-3B).

선행된 60∼90 nm 초박절편에 의한 2-D image 결과를 일차적으로 분석한 후, 이들 조직에 대한 100∼125 nm semi-thick 및 0.5∼1 μm의 후박절편에 이르기까지의 연속절편을 제작하여 색소체를 이루는 결정체 구조를 UHVEM을 이용하여 여러 단계의 잎에서 2차적으로 연구한 결과, 모든 단계의 엽육세포 색소체에 결정체가 형성되었으며, 결정체의 크기 및 분포는 분화 초기의 엽육조직에서부터 성숙 발달한 엽육조직에 이르기까지 큰 차이가 없었다. 결정체를 구성하는 미세요소들이 section angle에 따라 또는 UHVEM 상에서 일정한 각도로 tilting 함에 따라 상이한 구조 pattern을 보여 이들에 대한 tilting(±2도, ±5도, ±8도)을 실시하여 동일 결정체 내에서의 격자 또는 평행구조를 확인하였다. 이들 결정체 내에는 일정한 거리를 유지하는 수십 개의 막성계 요소들이 규칙적으로 배열하며 결정체 형성에 관여하는 것으로 나타났으며, 이는 약 ±60도까지 tilting하여 수합된 결과에서 막으로부터의 기원을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이들 결정체 또한 어떠한 종류의 막으로도 둘러싸이지는 않았으나 기질의 틸라코이드 막들이 결정체의 여러 측면에서 결정체를 직접 접하며 그 형성에 관여하는 것으로 추정되고 있다.

고 찰

세포의 미세구조 연구에서 UHVEM의 이용과 tomography에 의한 image 처리는 생체시료의 초미세구조 등의 연구에 큰 발전을 이루고 있으며, 이러한 기술은 세포의 3차원적 분석에서 핵심적인 역할을 하고 있다. 이들을 3차원적인 입체구조로 나타내려면 연속절편에 의한 image와 tilting에 의한 image들을 이용하여야 하는데, 연속절편을 이용하는 방법에서는 각각의 image들을 수합한 후, 정렬시키고 윤곽선을 추출하여 연구하고자 하는 세포나 세포내 소기관을 입체구조로 표현한다(Koster et al., 1997; Frank et al., 2002). Tilting에 의한 image 처리법에서는 동일한 시료를 ±60도에 이르기까지 일정한 각도로 기울여가며 연속적으로 image를 촬영하여 정보가 획득되면 영상 정렬을 거쳐 3차원적으로 표현된다. 이때 생체 시료가 두꺼울수록 심도 있는 구조정보를 얻어낼 수 있으므로

높은 해상력으로 두꺼운 시료 절편을 투과할 수 있는 UHVEM을 사용해야 된다. 이렇게 수합된 정보는 적절한 image processing 과정을 거치며 optical section 되어 새로운 serial image로 수합되어 3차원적 입체구조로 재구성되는 것이다(Kremer et al., 1996; Koster et al., 1997).

색소체는 광합성을 수행하는 식물세포내 주요 소기관으로 기능적으로 복잡한 구조(Waters & Pyke, 2005)일 뿐만 아니라 분열하여 증식할 수 있고, 분화하여 특수한 기능과 구조를 갖는 다른 형태로 변화할 수 있는 역동적인 구조이다(Ryberg et al., 1993; McDonald, 2003; Waters & Pyke, 2005). 특히 CAM 광합성을 수행하는 일부 종의 엽육세포 색소체 기질에 결정상의 구조체가 형성됨이 알려지고 있어(Salema & Brandao, 1978; Santos & Salema, 1981, 1983; Ryberg et al., 1993; Kim 1997) 이들 구조에 대한 관심이 높아지고 있다. 최근 우리나라에서도 *Sedum rotundifolium* 색소체내 결정체를 초고압전자현미경으로 연구하여 결정체를 이루는 구성요소들에 대한 입체적 구조가 보고되어(Kim, 2006a, b) 식물세포 및 세포소기관에 대한 입체구조 연구가 관심을 받게 되었다. 그러나 외국에서는 이러한 영역의 중요성이 이미 인식되어 특정 식물세포 또는 특정 미세구조에 대한 UHVEM의 이용과 tomography에 의한 image 처리법으로 3차원적 입체구조 연구가 활발하게 진행되고 있다. 대표적인 예로 중력감지체(Smith et al., 1997), 액포(Saito et al., 2002; Katsuna et al., 2003), 세포분열(Otegui et al., 2001; Otegui & Staehelin, 2004; Segui-Shimarro et al., 2004), 세포막의 역동성(Verma & Hong, 2005) 등의 특정 세포소기관이 3차원적 입체구조로 연구되어 심도 있는 세포학적 정보가 지속적으로 도출되고 있다.

본 연구는 UHVEM 및 tomography를 이용하여 광합성 유형에 따라 특이하게 발달하는 CAM 및 C_4 식물 엽육조직 색소체에 발달하는 초미세구조들을 3차원적 입체구조로 다음과 같이 분석 비교하였다. 결정체를 구성하는 초미세 요소들에 대하여 1차적으로 수집된 2-D image 들에 디지털화한 image의 3차원 영상 재구현시 필수적인 IMOD를 사용하고, tilting 및 tomography 기법 등의 이용으로 image를 처리하였다. 이러한 과정을 통해 UHVEM 전자현미경으로부터 얻어진 data에서 초미세 세포영상의 구조정보를 추출하여 세포수준에서의 3-D 입체구조 image로 재구현하였다. CAM 식물 *Sedum rotundifolium*에서는 색소체에 분화하는 결정체내 초미세구조들의 특성을 연구하였고, 세포유형에 따라 상이하게 발달하는 C_4 식물 *Salsola komarovii* 색소체에서는 결정체 형성에 관여하는 것으로 추정되는 구성요소들을 조사하였다. *S. rotundifolium*의 색소체내 결정체들은 엽육세포의 분화초기 단계에서 수 μm에 이르기까지 크게 발달하였다. 광합성 엽육조직이 유관속초세포 및 엽육세포로 분화하는 C_4 광합성 수행 *S. komarovii*에서는 색소체 내 결정구조는 특히 엽육세포에서만 발달하였다. 결정체를 구성하는 초미세구조 요소들은 section angle에 따라 결정체 내에서 격자구조 또는 평행구조를 이루었다. *Sedum* 색소체 결정체는 약 20 nm의 격자거리로 이루어진 수백-수천 개 이상의 미세소관성 요소들이 규칙적으로 배열된 정교한 구조임이 밝혀졌다. C_4 광합성을 수행하는 *Salsola komarovii* 색소체 결정구조는 작게 형성되며, 인접하는 기질의 틸라코이드막이 결정체 형성에 관여하는 것으로 추정되었다. *Sedum* 및 *Salsola* 색소체 결정체들은 모두 녹말입자와는 인접하여 발달하나 막으로는 둘러싸이지 않는 특징을 갖는다.

이러한 결정체는 *Sedum* 및 *Salsola* 식물체에서 엽육세포와 인접하고 있는 표피세포의 경우에도 색소체 내부에 발달하는 것으로 1차 연구에서 조사된 바 있다(unpublished data). 그러나 이들이 엽육세포 색소체에서와 같이 미세소관성 요소로 구성되어 있는지 혹은 인접하고 있는 막성계와 연관되어 있는지, 아니면 전혀 다른 구조적 특성을 지니며 분화 발달하는지는 연구되어 있지 않다. 이러한 특성을 알아내기 위해 현재 연속절편 및 tilting 기법과 tomography에 의한 이들 표피세포 색소체에 대한 UHVEM 연구가 계속 진행되고 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.

Gilbert PFC: Reconstruction of a 3-dimensional structures from projections and its application to electron microscopy II. Direct methods. Proc R Soc Lond B Biol Sci 182 : 89-102, 2002.

Gilky JC, Staehelin LA: Advances in ultra-rapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure. J Electron Microsc Tech 3 : 177-210, 1986.

Gunning BES, Steer MW: Plant Cell Biology: Structure and Function. Jones and Bartlett Publishers, Boston, pp. 1-60, 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 microtubules in young leaves of *Sedum rotundifolium*. J Plant Biol 40 : 115-119, 1997.

Kim I: High Voltage Electron Microscopy of Structural Patterns of Plastid Crystalline Bodies in *Sedum rotundifolium*. Kor J Electron Microsc 36 : 73-82, 2006a.

Kim I: Changes in plastid ultrastructure during *Sedum rotundifolium* leaf development. J Plant Biol 49, 2006b. (in press)

Kim I, Fisher DG: Structural aspects of the leaves of seven species of *Portulaca* leaves growing in Hawaii. Can J Bot 68 : 1803-1811, 1990.

Koster AJ, Grimm R, Typke D, Heherl R, Stoscheck 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.

Lee YN: Flora of Korea. Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, p. 271, 1996.

Mastronarde DN: Dual axis tomography: An approach with alignment methods that preserve resolution. J Struct Biol 120 : 343-352, 1997.

McDonald MS: Photobiology of Higher Plant. Wiley, Chichester, 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: 3D tomographic analysis of postmeiotic cytokinesis during pollen development in *Arabidopsis thaliana*. Planta 218 : 501-515, 2004.

Pyankov V, Ziegler H, Kuzmin A, Edwards G: Origin and evolution of C_4 photosynthesis in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae) based on anatomical and biochemical types in leaves and cotyledons. Plant Syst Evol 230 : 43-74, 2001.

Reiner H: The EM program package : A platform for image processing in biological electron microscopy. J Struct Biol 116 : 30-34, 1996.

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.

Sage RF, Monson RK: C_4 Plant Biology. Academic Press, San Diego. pp. 49-209, 1999.

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.

Salemma 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.

Voznesenskaya EV, Franceschi V, Artyusheva EG, Black

CC, Pyankov VI, Edwards E: Development of the C_4 photosynthetic apparatus in cotyledons and leaves of *Salsola richteri* (Chenopodiaceae). Int J Plant Sci 164 : 471-487, 2003

Waters M, Pyke K: Plastid development and differentiation. In: Moller SG, ed, Plastids, pp. 30-59, Blackwell Publishing, Oxford, 2005.

<국문초록>

발달중인 *Sedum* 및 *Salsola*의 엽육조직을 chemical fixation과 high pressure freezing (HPF) 등으로 고정한 후, 초박 및 후박절편으로 제작 carbon coating하여 TEM 및 UHVEM으로 연속절편에 의한 2-D 영상과 tilt image data를 수집하였다. 이후 초미세 구조들에 대하여 tilting 및 tomography 기법, 그리고 디지털화한 image의 3-D 입체구조 재구현에 필수적인 IMOD 프로그램을 적용한 image 처리과정을 거쳐 UHVEM data에서 색소체내 초미세구조의 정보를 추출하여 세포수준에서의 3-D image를 분석하였다. 색소체 기질에서 녹말입자 및 틸라코이드에 인접하여 형성되는 CAM 및 C_4 식물 색소체 결정체들은 어떤 막으로도 둘러싸이지 않는 구조로서, *Sedum rotundifolium* 색소체내 결정체는 수 μm에 이르는 커다란 크기로 형성된다. 결정체 내에는 약 20 nm 격자거리로 이루어진 기원을 알 수 없는 수백-수천 개의 미세소관성 요소들이 평행 또는 격자상태로 정교한 구조를 이루며, 티라코이드 및 녹말입자와 인접하여 발달하였다. C_4 광합성 수행 *Salsola komarovii*의 경우, 결정체는 엽육세포 색소체에서만 발달하며 결정체 구성 기본요소들이 비교적 규칙적인 격자거리를 이루며 수십 개 배열하는 구조를 형성하였다. 특히, tilted image 및 3-D 입체구조 연구에서 결정체 형성에는 이들과 인접하여 발달하는 틸라코이드막이 관여함을 알아 낼 수 있었다. 이는 엽육세포 색소체에는 결정체들이 식물이 수행하는 광합성 유형에 따라 각기 다른 구성요소로 형성되어 *Sedum*의 경우와 같이 발달 중인 엽육조직에서 분화하거나 *Salsola*에서와 같이 세포 유형에 따라 상이하게 발달하는 것으로 추정되었다.

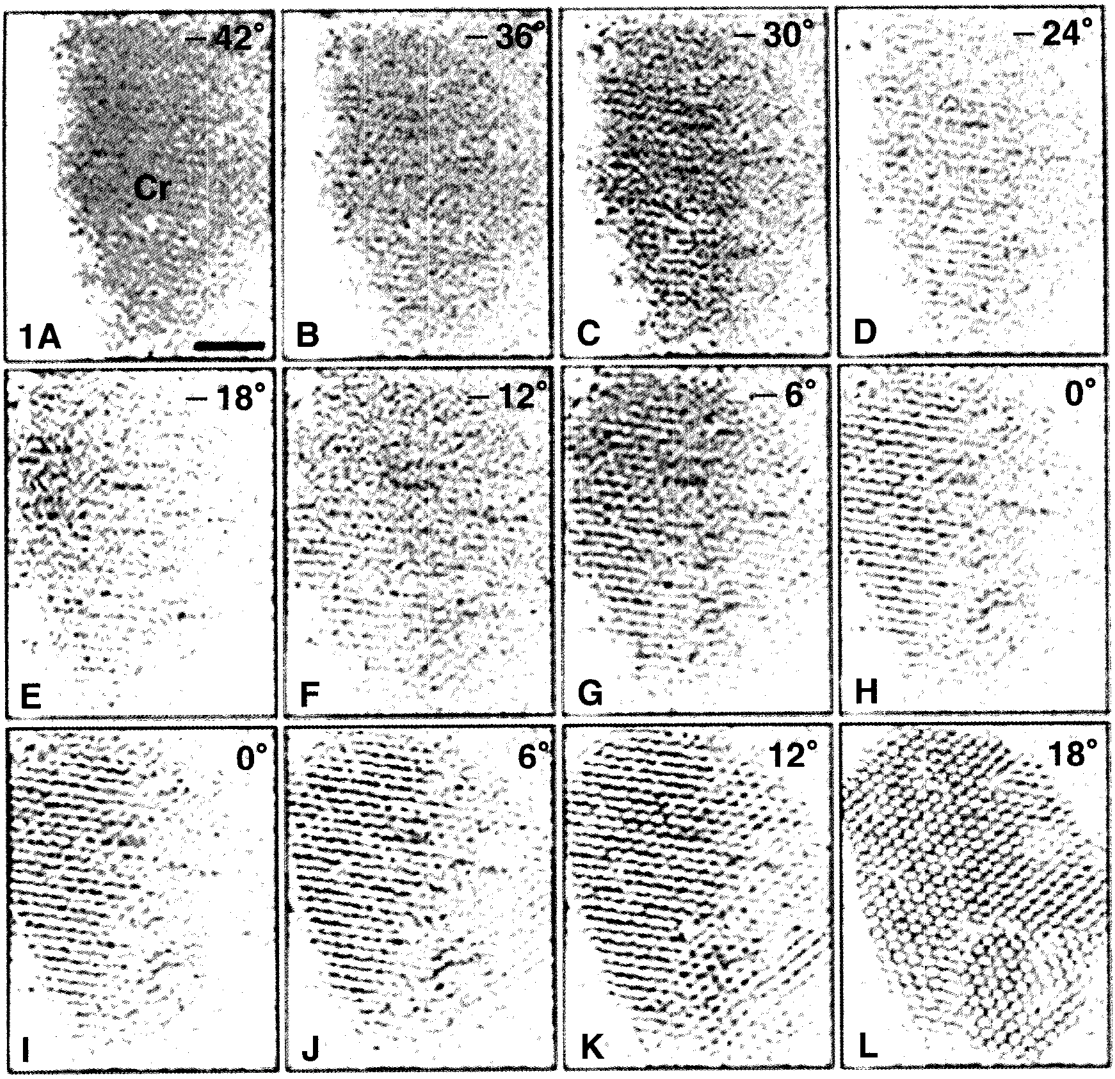
FIGURE LEGENDS

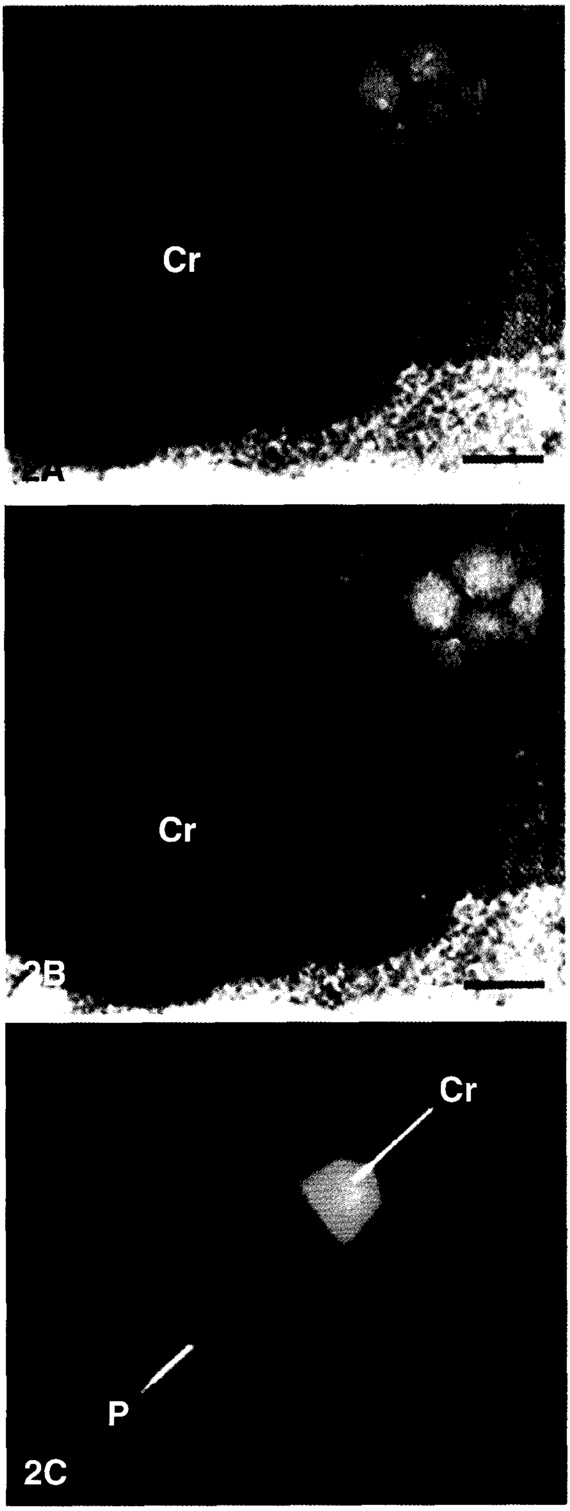
Fig. 1. Tilted images of the plastid crystalline inclusion (Cr) showing different tubular element in varying degrees. *S. rotundifolium.* Bar=0.2 μm.

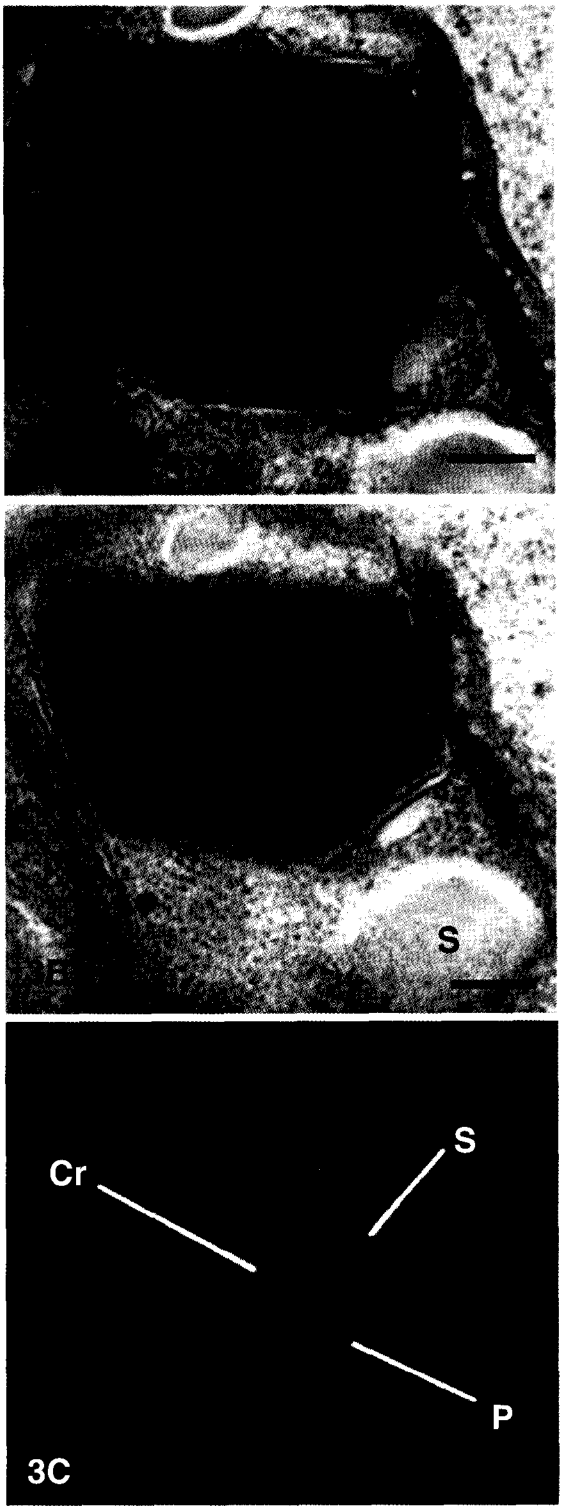
Fig. 2. Two different images of the crystalline inclusion (Cr) viewed at 0° (A) and −20° (B) in *S. rotundifolium.* Notice the disappearance of the crystalline pattern at −20°. Bar=0.2 μm. C: 3-D reconstruction of the plastid (P) with a crystalline inclusion (Cr) in *S. rotundifolium.* Side view.

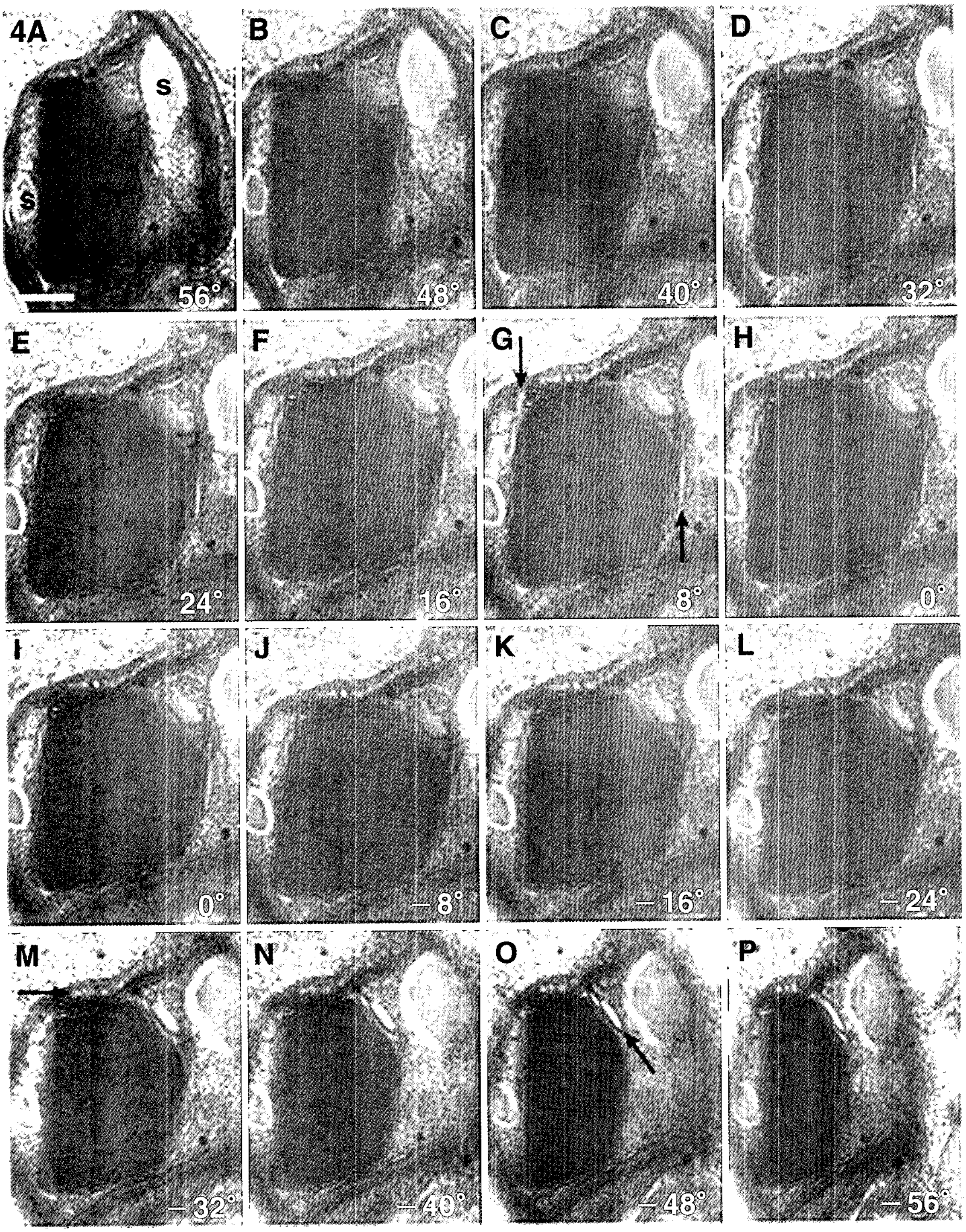
Fig. 3. Two different images of the plastid inclusion in *S. komarovii*, exhibiting obvious spatial relationship between thylakoidal membranes and the inclusion (Cr). A: +30°, B: −30°. S=starch grain. Direct involvement of the thylaoidal membranes are clearly indicated by the arrows. Bar=0.15 μm. C: 3-D reconstruction of the plastid (P) with the inclusion (Cr) and starch grain (S) in *S. komarovii.*

Fig. 4. Tilted images of the plastid demonstrating close relationships among the crystalline inclusion (Cr), starch grains (S), and thylakoidal membranes (arrows) in *Salsola komarovii.* Arrows indicate thylakoidal membranes that attached to the peripery of the inclusion. Bar=0.2 μm.


−42°
Cr
1A
−36°
B
−30°
C
−24°
D
−18°
E
−12°
F
−6°
G
0°
H
0°
I
6°
J
12°
K
18°
L


Cr
2B
Cr
Cr
P
2C


S
Cr
S
P
3C


4A
s
s
56°
B
48°
C
40°
D
32°
E
24°
F
16°
G
8°
H
0°
I
0°
J
– 8°
K
– 16°
L
– 24°
M
– 32°
N
– 40°
O
– 48°
P
– 56°