한국현미경학회지 제39권 제4호 2009
Korean J. Microscopy 39(4), 333~340(2009)

바위솔속 엽육조직 세포 내 액포의 미세구조 분화 양상

김 인 선
계명대학교 자연과학대학 생물학과

Ultrastructural Differentiation of the Vacuole in Mesophyll Tissues of *Orostachys*

InSun Kim
Biology Department, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
(Received November 11, 2009; Accepted December 24, 2009)

ABSTRACT

In the present study, ultrastructural features of the mesophyll tissue have been investigated in Crassulacean acid metabolism (CAM)-performing succulent *Orostachys*. A large central vacuole and numerous small vacuoles in the peripheral cytoplasm were characterized at the subcellular level in both developing and mature mesophyll cells. The most notable feature was the invagination of vacuolar membranes into the secondary vacuoles or multivesicular bodies. In many cases, tens of single, membrane-bound secondary vacuoles of various sizes were found to be formed within the central vacuole. multivesicular bodies containing numerous small vesicles were also distributed in the cytoplasm but were better developed within the central vacuole. Occasionally, electron-dense prevacuolar compartments, directly attached to structures appearing to be small vacuoles, were also detected in the cytoplasm. One or more huge central vacuoles were frequently observed in cells undergoing differentiation and maturation. Consistent with the known occurrence of morphologically distinct vacuoles within different tissues, two types of vacuoles, one representing lytic vacuoles and the other, most likely protein storage vacuoles, were noted frequently within *Orostachys* mesophyll. The two types coexisted in mature vegetative cells but did not merge during the study. Nevertheless, the coexistence of two distinct vacuole types in maturing cells implies the presence of more than one mechanism for vacuolar solute sorting in these species. The vacuolar membrane is known to be unique among the intracellular compartments for having different channels and/or pumps to maintain its function. In CAM plants, the vacuole is a very important organelle that regulates malic acid diurnal fluctuation to a large extent. The membrane invagination seen in *Orostachys* mesophyll likely plays a significant role in survival under the physiological drought conditions in which these *Orostachys* occur; by increasing to such a large vacuolar volume, the mesophyll cells are able to retain enormous amounts of acid when needed. Furthermore, the mesophyll cells are able to attain their large sizes with less energy expenditure in order to regulate the large degree of diurnal fluctuation of organic acid that occurs within the vacuoles of *Orostachys*.

Keywords : Membrane invagination, Mesophyll, *Orostachys*, Secondary vacuoles, Succulents, Ultrastructure

* 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

활발히 분화하는 다육질성 식물세포에는 세포의 대부분을 차지하는 액포가 발달하며, 각각의 액포는 액포막(vacuole membrane)에 둘러싸여 세포내 다른 구조 및 물질들로부터 격리・보호된다. 액포에는 물, 무기이온, 유기산, 효소, 방어물질, 색소 등의 다양한 대사산물과 결정체, 노폐물 등이 함유되어 있고, 이들을 주기적으로 다른 산물로 전환시키는 기작은 액포 및 액포막의 주요한 기능 중의 하나이다(Marty, 1999; Andreev, 2001). 또한, 액포의 독특한 세포 팽창 기작은 세포 크기 증가에서 핵심적인 역할을 하며, 액포는 세포내에 한 종류 이상 발달할 수 있다(Parie et al., 1996).

바위솔속(*Orostachys*) 식물은 줄기 및 잎 등의 지상부위가 다육질성으로 발달하여 식물체 내 생리적 건조가 지속되는 열악한 환경에서 적응・생존한다. 다육질성 식물의 일반적인 구조적 특성으로는 식물체 표면적 대비 최대용적(high volume to surface ratio), 엽육조직의 높은 다육질성 지수(mesophyll succulence index), 소수의 기공, 수분저장세포(water storage cells) 내 액포의 발달, 유관속의 미분화 등이 알려져 있다(Gibson, 1982; Kim et al., 1995a, b; Kim, 1996). 이러한 특성은 바위솔속에서도 나타나 일부 종에서는 엽육조직에 십 수층에 이르는 두터운 수분저장세포층을 형성하여 환경에 적응하기도 한다(Kim, 1996). 이들 다육질성 식물은 환경적응 및 생존을 위해 다른 식물들에서는 찾아볼 수 없는 독특한 대사양식인 Crassulacean acid metabolism (CAM) 광합성을 수행한다(Kluge & Bruelfert, 1996; Hartwell, 2005).

대부분의 CAM 식물은 식물체의 잎 또는 줄기 등이 다육질성으로 발달한다. 밤에 열린 기공으로 CO_2를 흡수하여 말산(malic acid)과 같은 유기산을 형성・저장하고, 낮에는 기공을 닫은 채 이를 분해하여 전분(starch)으로 만드는 특이한 유기산 대사를 수행한다. 돌나물과(Crassulaceae)에 속하는 다육질성 식물을 주축으로 하여 일어나는 이러한 광합성이 Crassulacean acid metabolism (CAM)이며, 이러한 경로를 수행하는 식물을 CAM 식물이라 한다. CAM 식물은 광합성 기작이 구조적으로나 기능적으로 특수한 환경조건에 적응되어 있어 CO_2를 고정하는 시간과 유기물을 합성하는 시간이 서로 다르게 나타난다. 이러한 특성은 특히 CAM 식물 엽육조직 세포 내 액포 및 액포막에서의 구조적・기능적 조절에 의해 일주기성(diurnal fluctuation)으로 지속된다(Smith et al., 1996; Hartwell, 2005).

바위솔속 식물은 돌나물과에 속하는 CAM 식물로 구조와 기능의 분화가 환경조건에 잘 적응되어 다른 광합성 양식을 수행하는 식물들과는 매우 다른 생리생화학적 또는 구조적 특성을 보이며 광합성을 수행한다(Kim, 1996). 엽육세포와 유관속초세포가 엄격히 분리되어 말산형성과 탈탄산반응이 낮에 동시에 일어나는 C-4 식물(Leegood & Walker, 1999)과 달리 CAM 식물은 이 두 과정이 같은 세포에서 일어난다. 제1과정은 밤에, 다른 제2과정은 낮에 진행되고, 이들의 커다란 액포가 말산을 저장함으로써 밤에 pH 3～4에 이르는 매우 낮은 세포질의 pH를 야기한다. 이는 밤에 합성된 말산이 낮에 소비되어 세포 내 엄청난 수소이온 농도의 차이가 일주기성으로 일어나는 것으로 CAM 식물의 가장 뚜렷한 대사적 특징이다. CAM 광합성을 수행하는 일부 다육질성 식물에서 생장단계상 또는 일주기성 현상으로 세포질 또는 액포에 막성계의 구조적 변화가 관찰되었으나(Kim, unpublished) 이들에 대한 연구는 자세히 이루어지지 않고 있다. 다육질성 식물 액포에 대한 연구는 오래 전부터 CAM 광합성과 연계되어 생리학적 측면이나 생화학적으로 매우 활발하게 진행되고 있다. 그러나 이러한 연구는 *Kalanchoe*, *Sedum* 등의 일부 다육질성 CAM 식물에 국한되어 있고(Steudle et al., 1980; Edwards et al., 1996; Kluge & Bruelfert, 1996; Hartwell, 2005), 바위솔속 등의 다른 다육질성 식물의 엽육조직이나 세포 특성에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 암벽 등에 서식하여 식물체 내 생리적 건조가 지속되는 바위솔속 식물의 엽육조직을 세포수준에서의 분화발달 양상에 초점을 두어 미세구조적으로 자세히 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서는 대표적 바위솔속(*Orostachys*) 식물인 바위솔(*O. japonucus*), 둥근바위솔(*O. malacophyllus*), 난장이바위솔(*O. sikokianus*) 3종이 실험에 사용되었다. 생식시기에 도달하지 않고 활발히 생장하는 단계(vegetative growth)의 식물체 5～7 개체가 자생지(바위솔, 난장이바위솔: 대구광역시 팔공산, 둥근바위솔: 경상북도 경주시 감포읍 해안가)에서 채취되었다. 실험실로 옮겨진 이들 식물체들로부터 어린 잎 및 성숙한 엽신(leaf blade) 중앙부위(median region) 또는 측부 엽육조직이 생장단계별로 수차례 sampling되어 실험재료로 사용되었다.

2. 실험방법

SEM 주사전자현미경으로 연구될 엽육조직을 실온에서 3% glutaraldehyde 용액으로 3시간 1차 고정(prefixation)한 후 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 용액으로 15분씩 3회 세척하였다(Kim & Fisher, 1990; Kim, 1996). 세척된 시료는 2% aqueous OsO_4로 4˚C에서 2～12시간 2차 고정(postfixation)하여 위의 phosphate buffer로 15분씩 3회 세척

되었다. 고정되어 세척된 시료는 30% acetone을 시작으로 10% 상승 단계별로 탈수과정을 거쳤다. 이후 이들 시료는 EMITECH K850에서 liquid CO_2에 의한 임계점 건조(critical point drying)를 거쳐 약 20 nm의 금속피막(Pt coating)을 입힌 후 한국기초과학지원연구원 대구센터 소재 Hitachi S-4200 SEM으로 20 kV에서 분석되었다.

TEM 투과전자현미경으로 연구될 시료들은 SEM 방법과 동일한 고정 및 탈수과정을 거쳐 acetone-Spurr resin 혼합용액으로 각각 1시간씩 실온의 rotator 상에서 치환(substitution)되고, 100% Spurr resin 용액으로 침투(infiltration)시킨 후 포매(embedding)되었다. 일부 시료는 1차 고정 후 70% methanol 용액을 사용하여 제조된 3% uranyl acetate에서 3시간 en bloc staining 처리된 후 buffer에 의한 세척 및 아세톤 탈수된 후 포매되었다. 포매된 시료는 65˚C 건조기 내에서 48시간 동안 중합경화(polymerization)된 후 resin block으로 제작되었다. 제작된 resin block은 Reichert Ultracut-S ultramicrotome으로 0.5～1.0 μm 후박절편(thick section)을 만든 후 0.3% Toluidine Blue 용액으로 염색하여 Jenaluma Zeiss 광학현미경을 통해 초박절편으로 사용할 조직을 조사하였다. 수차례 fine trimming 후 diamond knife로 60～90 nm 초박절편(ultrathin section)을 제작하여 3% chloroform formvar coated grid로 옮긴 후 2% uranyl acetate (45분, 65˚C)와 lead citrate (30분, 실온)으로 이중염색(double staining)되었다. 이러한 과정을 거친 초박절편은 Hitachi H-7100 TEM (한국기초과학지원연구원 대구센터 소재)을 이용하여 75 kV에서 연구되었다.

결 과

해안가 바위 또는 산지의 암벽 등 열악한 환경에 서식하는 실험된 3종의 바위솔속 식물체 표피에는 각피층(cuticle layer)이 발달하여 내부 엽육조직을 보호하였다. 이들 식물의 다육질성 엽육조직은 세포 체적의 대부분을 차지하는 액포가 주축을 이루는 수분저장성 세포들로 구성되어 있고, 발달 중의 엽육조직 세포에는 다수의 작은 액포들이 치밀한 세포질에 지속적으로 생성되면서 널리 분포하였다(Fig. 1). 특히, en bloc 과정을 거친 조직에서는 전자밀도가 높은 소액포들이 뚜렷이 염색되어 소액포 분화 추적연구는 비교적 용이하였다. 일부 소액포들은 전자밀도가 높은 물질을 함유한 작은 전액포(prevacuole)로부터 기원하였으며, 세포가 성숙함에 따라 전액포는 서로 융합하여 소액포 또는 커다란 액포를 형성하였다. 이때 세포질은 세포체적의 대부분을 차지하는 액포로 인하여 세포벽 주위로 밀려나 엷은 층으로 국한되었고, 세포소기관들은 액포와 밀접하게 연계되면서 정상적으로 발달하였다. 세포질에는 미토콘드리아, 엽록체 등이 잘 발달하고, 일부 엽록체의 기질에는 결정체(Fig. 2) 또는 미세소관성 구조들(microtubule-like structures)이 peripheral reticulum 사이에 형성되었다(Figs. 3, 4). 이후 세포가 신속하게 분화되면서 소액포들이 융합하여 커다란 액포를 형성하는 액포화현상(vacuolization)이 더욱 빠르게 진행되었다.

성숙한 엽육세포에서 흔히 일어나는 현상은 다양한 형태의 액포융합과 막 함입에 의한 2차 액포 형성으로 세포 내 거의 전 부위서 진행되었다(Fig. 5). 이러한 액포화는 세포질 또는 중앙의 큰 액포 내에서 작은 여러 크기의 액포들이 형성된 후 융합하는데 동일한 현상은 여러 부위의 세포질에서도 관찰되었다. 일부 세포에서는 작은 액포들이 지속적으로 생성되면서 세포질에 분산되었는데 이들 중 일부는 원형질막으로부터 기원하여 세포질을 통과하여 곧 바로 중앙의 액포로 융합하였다. 또한, 세포벽과 액포 사이에 분포한 엽록체 주변의 극히 협소한 세포질에서도 여러 크기의 액포들이 융합하여 거대한 중앙의 액포(central vacuole)를 형성하거나 액포막 함입에 의한 많은 2차 액포들이 생성되었다. 이때 매우 빠르게 진행되는 막 융합에 의해 액포막은 완만한 상태(smooth outline)를 이루기 전의 파상(undulated outline)의 형태로 관찰되었다(Fig. 6). 이러한 액포막 함입(invagination)에 의한 2차 액포(secondary vacuoles) 형성은 가장 주목할 만한 특이한 현상으로 세포 내 여러 부위에서 일어나 엽록체 주변(Figs. 6, 7), 극히 제한된 세포질 내(Fig. 8) 또는 세포벽 전면을 따라(Fig. 9) 수십 개씩 형성되었다. 일부 세포에서는 초기의 소액포가 원형질막으로부터 기원하여 세포질을 가로지르며 빠르게 분화하여 커다란 중앙의 액포에 바로 연결되었다(Fig. 10). 또한, 액포 내에는 액포막 변형에 의해 단일막으로 둘러싸인 multivesicular bodies나 막의 한 부분이 동심원적으로 정교하게 배열된 plasmalemmasome과 같은 막성계 구조들이 흔히 발달하였다(Fig. 10 Inset a, b). Multivesicular bodies의 경우, 세포질에서도 분포하였으나 그 빈도는 비교적 낮게 나타났다.

액포는 동일한 세포 내에서도 한 종류 이상 발달하여 위에 언급된 용해성 액포(lytic vacuole) 외에 1～2 μm 크기의 저장성 액포(storage vacuole)로 대별되었다. 대부분의 용해성 액포가 다육질성 식물세포에 필수적으로 크게 발달하는 것과 같이 3종 바위솔속 엽육세포에서도 소낭 크기에서 거대한 중앙액포에 이르기까지 다양한 크기로 발달하였다. 반면, 저장성인 경우에는 수 μm 크기의 작은 액포들로 분화되고 전자밀도가 높은 물질이 축적되어 발달 중의 세포 및 성숙한 세포에서 모두 다른 용해성 액포들과는 뚜렷이 구별되었다(Figs. 11, 12). 인접한 세포 간 세포벽에는 전형적인 원형질연락사 외에 복잡한 미로를 형성하여 2차적인 기원으로 추정되는 원형질연락사들(secondary plasmodesmata)이 분화되어 위치하였다(Fig. 13).

고 찰

열악한 환경에 서식하여 식물체 내 생리적 건조가 지속되는 바위솔, 난장이바위솔, 둥근바위솔의 다육질성 엽육조직 세포의 특성을 액포 구조분화에 초점을 두어 미세구조적으로 연구하였다. 바위솔속 식물의 다육질성 엽육조직은 대부분 수분저장성 세포들로 구성되어 있으며, 이들 세포 내에는 액포융합 현상, 세포질 또는 액포 내 다양한 2차 액포 형성, 액포, 엽록체, 미토콘드리아 간의 밀접한 분포, 세포 간 원형질연락사의 발달 등이 특징적으로 나타났다. 본 연구에서는 이러한 구조적 특성과 여러 다육질성 CAM 식물에서 밝혀진 특성을 연계하여 비교 분석하였다.

돌나물과(Crassulaceae) 식물을 주축으로 하여 일어나는 CAM 광합성은 다육질성 엽육조직에서 구조와 기능의 분화가 환경조건에 잘 적응되어 합리적인 특성을 보이며 진행된다. 이들 식물의 광합성 기작은 구조적으로나 기능적으로 특수한 환경조건에 적응되어 있어 CO_2를 고정하는 시간과 유기물을 합성하는 시간이 서로 다르게 나타나 밤에 기공을 열어 CO_2를 흡수하여 말산 등의 유기산을 형성・저장하고, 낮에 이를 분해, 전분으로 만드는 특이한 유기산 대사를 수행한다. CAM 광합성은 초기산물로 C-4 화합물인 말산을 생성하는 C-4 회로에 해당하나 C-4 광합성과는 달리 모든 과정이 같은 엽육세포에서 이루어지고(Kluge & Bruelfert, 1999), 이들의 커다란 액포가 말산을 저장함으로써 밤에 매우 낮은 세포질의 pH가 주기적으로 야기되더라도 항상성을 유지할 수 있게 해준다.

CAM 식물의 가장 뚜렷한 대사적 특징이 밤에 말산을 합성하고 낮에 이용하는 것이므로 이들을 저장하는 액포는 낮과 밤사이에 약 $10^3 \sim 10^4$에 이르는 엄청난 pH의 차이를 일주기성으로 조절해야만 한다. 액포막에 둘러싸여 세포 내 다른 구조 및 물질들로부터 격리・보호되고, 저장된 물질들을 주기적으로 다른 산물로 전환시키는 기작은 액포 및 액포막의 주요한 기능 중의 하나로 일주기성으로 급변하는 세포 내 pH 농도 차이를 극복해야 하는 CAM 식물에서는 결정적 역할을 수행하는 매우 중요한 세포소기관이다(Edwards et al., 1996; Marty, 1999). 특히, 성숙한 엽육조직의 수분저장세포에서는 세포의 90～95% 부위가 액체로 채워진 커다란 중앙액포 및 다양한 크기의 액포들이 차지한다. 액포에는 수분 외에 다양한 2차 대사산물이 함유되어 있어 액포에 용질이 능동적으로 축적되면 액포가 수분을 흡수할 수 있는 삼투압이 유발되고, 이는 식물세포의 신장을 위해서 필요한 요인이 된다. 액포화는 세포의 크기를 증가시키는 경제적이고 에너지 효율적인 방식으로 같은 부피의 단백질이 충만한 세포질보다 에너지가 훨씬 적게 든다. 이와 같이 액포는 세포의 크기 증가에서 핵심적인 역할을 하며, 액포에서의 수분흡수는 압력에 의해 유도된 세포팽창에서 독특한 기작을 제공한다(Marty, 1999).

액포는 수분 및 유기산, 특히 말산 저장의 기능을 수행할 커다란 pool로 작용을 하고(Foyer, 1984; Smith et al., 1996) 식물의 생리적 건조를 유발하는 조건에 buffer로 작용하여 이에 대처한다(Lawlor, 1993). 특히, 액포를 둘러싸는 액포막에는 액포 내・외로의 말산 운반에 직접적인 영향을 주고 이를 조절하는 특성효소가 분포하고 있다(Vitale & Raikhel, 1999; Beers et al., 2000; Jurgens, 2004; Park et al., 2004; Vitale & Hinz, 2005). 이러한 유형의 액포는 대부분의 다육질성 CAM 식물군에서 발달하며 낮과 밤에 일주기성으로 반복되는 세포 내 수소이온 농도의 급격한 변화를 대처할 수 있게 한다. 그러므로 본 연구의 바위솔속 엽육세포 세포질 또는 액포에 형성된 다양한 크기의 많은 2차 액포는 이러한 목적을 충족시켜 주는데 일주기적으로 사용되는 매우 중요한 세포내 구획(compartment)으로 간주된다.

액포는 이와 같이 CAM 광합성 및 세포 내 여러 대사과정을 동시에 수행하는 기능적으로 복잡한 세포 내 소기관이다. 본 연구의 많은 세포에서 관찰되었듯이, 이들은 매우 역동적이어서 분열하여 여러 개의 소액포를 형성하기도 하고 소액포들의 융합으로 큰 액포를 형성하면서 특수한 신진대사와 구조를 갖는 형태로 변형되기도 한다. 분열조직 등의 미분화된 세포에서 액포는 작은 전액포(prevacuole)로부터 기원할 수 있다(Bethke & Jones, 2000). 세포가 성숙함에 따라 전액포는 서로 융합하여 소액포 또는 커다란 액포를 형성하고, 세포질은 액포를 둘러싼 엷은 층으로 국한된다. 이러한 액포융합 현상은 연구된 3종 식물 엽육조직의 거의 대부분의 세포에서도 진행되었다. 이들 세포에서 세포질은 세포체적의 대부분을 차지하는 액포로 인하여 세포벽 주변부위로 밀려나 얇은 층으로 적게 분포하였다. CAM 식물세포에서는 약 1%의 세포질과 2%의 세포벽을 제외한 부분이 액포에 관련되어 있어(Steudle et al., 1980) 액포는 다육질성 엽육세포에서 매우 중요한 세포소기관으로 간주되고 있다. 얇은 세포질층을 이루는 이들 엽육세포 내에는 액포, 엽록체, 미토콘드리아가 밀접하게 연관되어 있는데, 본 연구의 바위솔속 엽육세포 내에도 이 구조들이 밀착되어 분포하였다. 일부 세포들 사이의 세포벽에는 전형적인 원형질연락사 외에 복잡한 미로를 형성하여 2차적인 기원으로 추정되는 원형질연락사들(secondary plasmodesmata)이 발달하였다. 원형질연락사의 발달은 아마도 다육질성 엽육세포가 일주기성으로 급변하는 세포 내 유기산 대사과정에 적응하기 위해 인접한 세포 및 액포에서의 신속하고 원활한 대사물질의 수송이 이루어져야 하기 때문일 것이다. 거대한 액포가 형성되어 기능을 수행하고 원형질연락사를 통한 세포 간의 긴밀한 상호관계가 대사과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다.

액포는 동일한 세포 내에서도 한 종류 이상 발달할 수 있는데, 이들은 용해성 액포(lytic vacuole)와 저장액포(storage vacuole)로 대별된다. 액포는 물, 무기이온, 유기산, 효소 등의 다양한 2차 대사산물을 포함하고 있다. 다육질성 식물세포에서 대부분 용해성인 액포는 필수적으로 크게 발달하나, 공간차지(space-filling) 역할 외에도 활용할 물질의 저장이나 재순환 또는 작은 분자들의 격리에도 이용된다(Marty, 1999; Neuhaus, 2004; Hara-Nishimura, 2005; Wright, 2009). 액포는 유용한 물질을 임시로 저장할 수 있으며, 분해 및 소화 액포는 대사물질을 이용 가능한 성분으로 분해하는 역할을 담당한다. 저장과 분해 액포의 동시 발달은 종자에서 일어나는데, 이는 종자발생 시 단백질 분해를 유도하여 식물 성장의 초기 과정에서 단백질 합성에 필요한 아미노산 방출에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Park et al., 2004). 그러나 본 연구의 바위솔속 식물 엽육조직 세포에서 관찰된 저장성 액포는 종자에서 알려진 저장성 액포와는 다른 것으로 향후 이들 액포 내 함유성분 및 기능에 대한 연구가 병행되면 다육질성 세포 내 액포의 구조 및 기능 수행 이해에 더 큰 도움을 줄 것이다.

참 고 문 헌

Andreev IM: Functions of the vacuole in higher plant cells. Russ J Plant Physiol 48 : 672-680, 2001.

Beers EP, Woffenden BJ, Zhao C: Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. Plant Mol Biol 44 : 399-415, 2000.

Bethke PC, Jones RL: Vacuoles and prevacuolar compartments. Curr Opin Plant Biol 3 : 469-475, 2000.

Edwards GE, Dai Z, Cheng SH, Ku MSB: Factors affecting the induction of Crassulacean Acid Metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. In: Winter K, Smith JAC, eds, Crassulacean Acid Metabolism. pp. 119-134, Springer, Berlin, 1996.

Foyer CH: Photosynthesis. Wiley & Son, New York, pp. 175-196, 1984.

Gibson AC: The Anatomy of Succulence. In: Ting IP, Gibbs M, eds, Crassulacean Acid Metabolism, Proc. of the 5th Annual Symposium in Botany, pp. 1-17, 1982.

Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M, Nishimura M: Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. Curr Opin Plant Biol 8 : 404-408, 2005.

Hartwell J: The Circadian Clock in CAM Plants. In: Hall AJW, McWatters, eds, Endogenous Plant Rhythms, pp. 211-236, Blackwell Publishing, Oxford, 2005.

Jurgens G: Membrane trafficking in plants. Annu Rev Cell Dev Biol 20 : 481-504, 2004.

Kim IS: Water storage cells in succulent *Orostachys malacophyllus*. Kor J Electron Microsc 26 : 457-463, 1996.

Kim IS, Fisher DG: Structural aspects of seven leaves of *Portulaca* growing in Hawaii. Can J Bot 68 : 1291-1306, 1990.

Kim IS, Pak JH, Seo BB, Song SD: Foliar structure and mesophyll succulence in three Korean *Orostachys* species and its phylogenetic implications. Kor J Plant Taxon 25 : 209-229, 1995a.

Kim IS, Pak JH, Seo BB, Song SD: Foliar ultrastructure of Korean *Orostachys* species. Kor J Electron Microsc 25 : 52-61, 1995b.

Kluge M, Brulfert J: Crassulacean Acid Metabolism in the Genus *Kalanchoe*: Ecological, Physiological and Biochemical Aspects. In: Winter K, Smith JAC, eds, Crassulacean Acid Metabolism, pp. 5-44, Springer, Berlin, 1996.

Lawlor DW: Photosynthesis: Molecular, Physiological and Environmental Process, 2nd ed., Longman Science & Technical, London, pp. 188-191, 1993.

Leegood RC, Walker RP: Regulation of the C4 pathway. In: Sage RW, Monson RK, eds, C4 Plant Biology, pp. 53-71, Academic Press, San Diego, 1999.

Marty F: Plant vacuoles. Plant Cell 11 : 587-600, 1999.

Neuhaus J, Rogers JC: Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. Plant Mol Biol 38 : 127-144, 1998.

Paris N, Stanley CM, Jones RL, Rogers CJ: Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. Cell 85 : 563-572, 1996.

Park M, Kim SJ, Vitale A, Hwang I: Identification of the protein storage vacuole and protein targeting to the vacuole in leaf cells of three plant species. Plant Physiol 134 : 625-639, 2004.

Smith JAC, Ingram J, Tsiantis MS, Barkla BJ, Bartholomew DM, Betty M, Pantoja O, Pennington AJ: Transport Across the Vacuolar Membrane in CAM Plants. In: Winter K, Smith JAC, eds, Crassulacean Acid Metabolism, pp. 53-71, Springer, Berlin, 1996.

Steudle E, Smith JAC, Lüttge U: Water-relation parameters of individual mesophyll cells of the Crassulacean Acid Metabolism plan, *Kalanchoe daigremontiana*. Plant Physiol 66 : 1155-1163, 1980.

Vitale A, Hinz G: Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? Trends Plant Sci 10 : 316-323, 2005.

Vitale A, Raikhel N: What do proteins need to reach different vacuoles? Trends Plant Sci 4 : 148-155, 1999.

Wright H, van Doorn WG, Gunawardena AHLAN: In vivo study of developmental programmed cell death using the lace plant (*Aponogeton madagascariensis*: Aponogetonaceae) leaf model system, Amer J Bot 96 : 865-876, 2009.

＜국문초록＞

다육질성 CAM 식물에서는 구조와 기능의 분화가 환경조건에 잘 적응된 합리적인 광합성을 수행하여 동일한 엽육세포에서 CO_2 고정, 유기물 합성과 저장, 분해 및 활용하는 시간이 서로 다르게 나타난다. 이러한 유기산 대사는 CAM 식물의 가장 뚜렷한 대사적 특징으로 밤에 말산을 합성하여 액포에 저장하고 낮

에 이용하므로 이들의 액포는 급격한 pH의 차이를 일주기성으로 조절해야 하는 매우 중요한 세포소기관이다. 본 연구에서는 식물체 내 생리적 건조가 지속되어 CAM 광합성을 수행하는 바위솔속 식물 3종의 다육질성 엽육조직 세포의 특성을 액포 구조분화에 초점을 두어 미세구조적으로 연구하였다.

바위솔속의 다육질성 엽육조직은 수분저장성 세포들로 구성되어 있으며, 액포융합 등의 액포화현상과 액포 내 다양한 2차 액포 형성이 현저한 구조적 특징이었다. 이들 액포는 매우 역동적이어서 분열하여 다수의 소액포를 형성하거나 소액포들의 융합으로 큰 액포를 형성하였고, 일부는 전자밀도가 높은 저장성 액포로 발달하였다. 이러한 액포화는 세포의 크기를 경제적이고 에너지 효율적으로 증가시키는 방식으로 대부분의 다육질성 CAM 식물에서 발달하며, 낮과 밤에 일주기성으로 반복되는 세포 내 pH 농도의 급격한 변화를 대처할 수 있게 한다. 또한, 막 함입에 의한 다양한 크기의 수많은 2차 액포 형성은 단 기간 내에 액포막의 용적을 증가시켜 이러한 목적을 충족시켜 주는데 일주기적으로 사용되는 매우 중요한 세포 내 구획이 된다. 액포의 신장으로 세포질은 세포벽 주변부위로 밀려나 얇은 층으로 국한되었으나, 이들 세포질 내에서도 엽록체와 미토콘드리아는 액포와 밀접하게 연관되어 분포하고, 세포 간에는 원형질연락사가 잘 발달하였다. 이러한 미세구조들의 발달은 다육질성 엽육세포가 일주기성으로 급변하는 세포 내 유기산 대사과정에 적응하기 위해 액포에서의 신속하고 원활한 대사물질의 수송이 이루어져야 하기 때문일 것으로 추정된다.

FIGURE LEGENDS

Orostachys malacophyllus: Figs. 1～6, 9～13, 10 Inset b, *Orostachys sikokianus*: Figs. 7～8, 10 Inset a, *Orostachys japonicus*: Fig. 13 Inset a, b

Fig. 1. Part of dense cytoplasm with seven small vacuoles (1～7) in a young mesophyll cell. An arrowhead indicates a prevacuolar compartment that is just beginning to initialize. C, chloroplast; CW, cell wall; m, mitochondria. Bar=0.5 μm.

Fig. 2. Part of a chloroplast exhibiting starch grains (S) and a crystal (CR). Bar=0.65 μm.

Fig. 3. A chloroplast with rudimentary thylakoids and traces of peripheral reticulum (arrowheads). Microtubule-like structures are indicated by an arrow. Initial formation of a storage vacuole (SV) is shown in the cell to the left. CW, cell wall; L, plastoglobulus. Bar=0.3 μm.

Fig. 4. A bundle of micorotubule-like structures (mt) found within peripheral stroma. G, grana; L, plastoglobulus; ST, stroma. Bar=1.5 μm.

Fig. 5. Membrane invagination (arrows) is shown among various expanding cells, while fusion of the vacuolar membranes to form a large central vacuole (V) is shown in the other cell (upper left, asterisk). N, nucleus. Bar=0.9 μm.

Fig. 6. Undulated vacuolar membranes (arrows) along the cell wall (CW). IS, intercellular space; mb, microbody; Vs, secondary vacuole (1～17). Bar=0.85 μm.

Fig. 7. Mature mesophyll cells, either with a huge central vacuole (V) or numerous secondary vacuoles (arrows), around the chloroplasts (C). IS, intercellular space. Bar=1.5 μm.

Fig. 8. Numerous secondary vacuoles (1～27) formed within very thin cytoplasm along the cell wall (CW). SV, storage vacuole. Bar=0.5 μm.

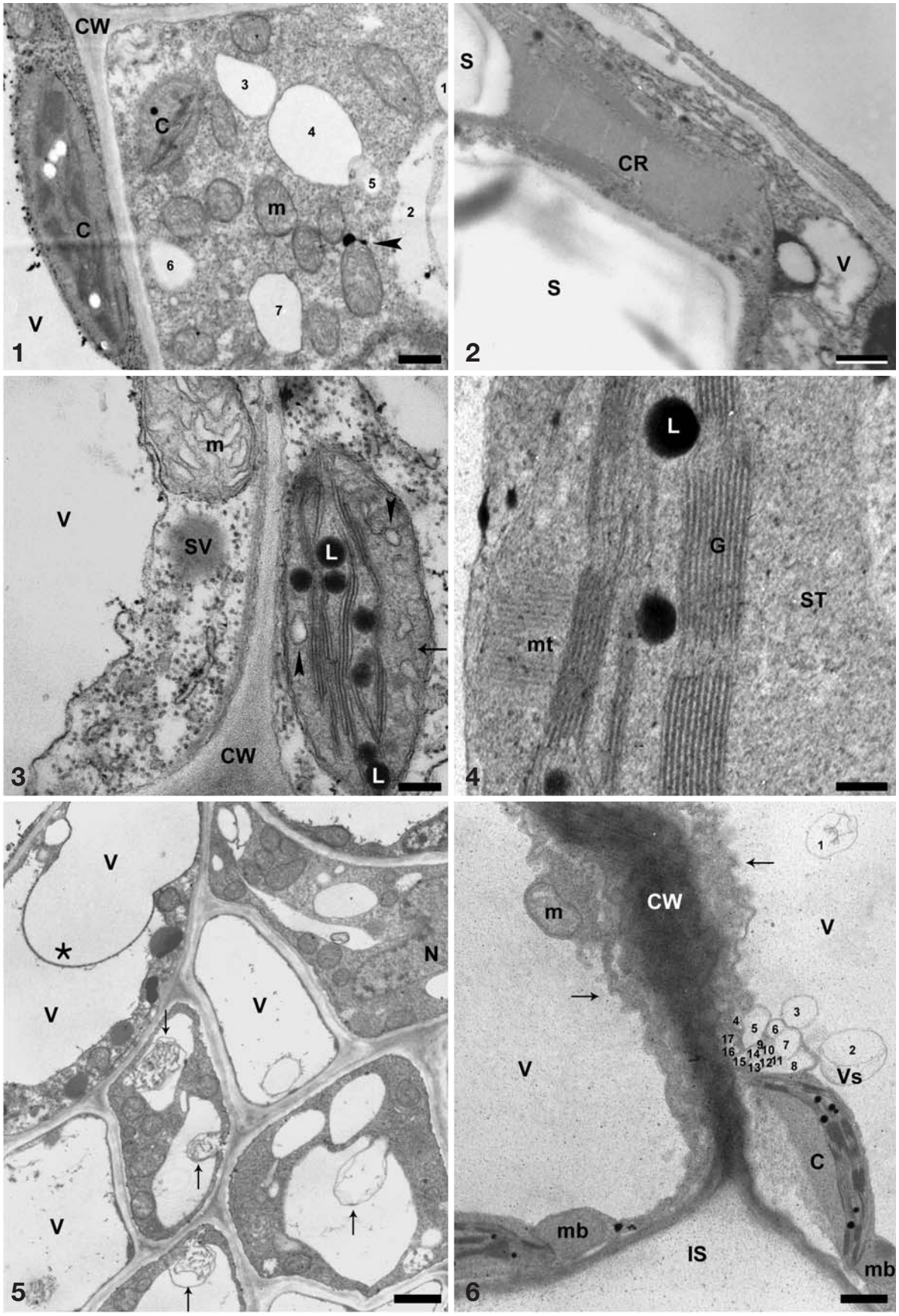
Fig. 9. Continuous formation of numerous secondary vacuoles (Vs, 1～88) along the surface of a wall. V, vacuole. Bar=3.0 μm.

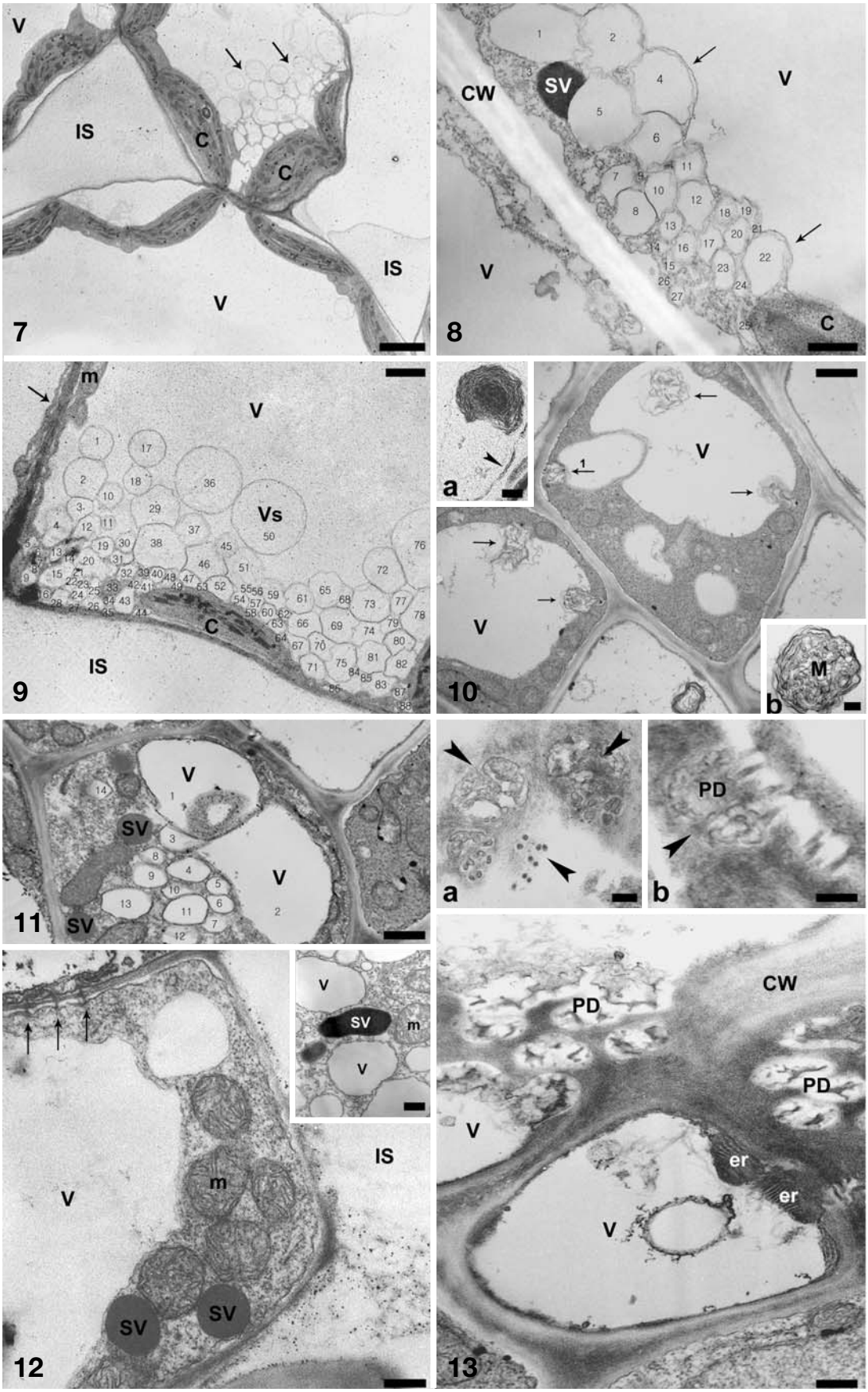
Fig. 10. Direct formation of the vacuole from the cell membrane (arrow number 1) passing through the cytoplasm to a large vacuole (V) in the center. Arrows indicate either secondary vacuole formation or multivesicular formation from the vacuolar membrane. Bar=0.85 μm. **Inset a**, Concentric membrane configuration of the plasmalemmasome with dragging membranes (arrowhead) detected in the vacuole. Bar=3.5 μm. **Inset b**, Multivesicular body found in the vacuole. Bar=2.0 μm.

Fig. 11. Coexistence of the two vacuole (V) types within a young mesophyll cell. Note the numerous lytic vacuoles (1～14) in various sizes. SV, storage vacuole. Bar=0.33 μm.

Fig. 12. Coexistence of the two vacuole types within a mature cell. V, lytic vacuole, SV, storage vacuole. Arrows indicate plasmodesmata. Bar=0.9 μm. **Inset**, Storage vacuoles (SV) surrounded by numerous lytic vacuoles. Bar=1.5 μm.

Fig. 13. Transverse section of the well-developed plasmodesmata (PD) in a cluster between neighboring cells. CW, cell wall; er, endoplasmic reticulum; V, vacuole. Bar=70 nm. **Inset a**, Plasmodesmata in transverse section (arrowheads). Bar=3.5 μm. **Inset b**, Plasmodesmata in longitudinal section (an arrowhead). Bar=0.45 μm.


CW
C
C
m
V
1
2
3
4
5
6
7
S
CR
S
V
2
m
V
SV
L
CW
L
3
L
G
ST
mt
4
V
*
V
V
N
V
5
1
CW
m
V
V
Vs
C
mb
IS
mb
6


V
IS
C
C
IS
V
7
CW
SV
V
V
C
8
m
V
Vs
C
IS
9
a
V
V
M
b
10
V
SV
V
SV
11
a
PD
b
v
SV
m
v
IS
V
m
SV
SV
12
CW
PD
PD
V
er
er
V
13