

# *Streptanthus tortus* 조직배양 세포에서 사공의 형성시기와 사공 영역과 사공의 크기 결정

조봉희

수원대학교 자연과학대학 생명과학과

## Determination of the Period of the Formation and Size of Sieve Element Area and Sieve Pore

CHO, Bong-Heuy

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

**ABSTRACT** During the phloem development from parenchyma cells in a suspension culture of *Streptanthus* induced sucrose carrier and glucose carrier disappeared. Sieve element area and sieve pore induced suspension culture of *Streptanthus* were formed almost at the last period of the synthesis of sieve endoplasmic reticulum (SER) and p-protein. The new synthesized cell wall began to digest only after the new cell wall was surrounded by SER. The digested region of the cell wall and the formed region of sieve pore were regular comparatively. The completed sieve pore was an oval form, and the outer portion of sieve pore varied, ca 1.2  $\mu\text{m}$ ~1.6  $\mu\text{m}$  in longitudinal, 0.8  $\mu\text{m}$ ~1.3  $\mu\text{m}$  in tangential, and the inner size of sieve pore was irregular form of a star-like shape. The number of sieve pore between sieve cells was ca 2~7 per  $\mu\text{m}^2$  and the sieve pore wall with callose was 0.05  $\mu\text{m}$ ~0.07  $\mu\text{m}$  in thickness. The energy for the formation of sieve element area and sieve pore might be supplied by mitochondria near the new cell wall and the role of SER remains to be elucidated.

**Key words:** SER, sieve pore, sieve pore area, sieve pore size

### 서 론

녹색식물에서 사부는 광합성으로 생성된 양분 (포도당)을 설탕 형태로 능동수송하여 축적시킨 후 축적된 설탕을 장거리 수송으로 식물체의 각 부분으로 전달하는 중요한 역할을 담당한다. 식물체에서 사부의 중요성을 인식하고 사부의 기능을 이해하기 위해서 많은 연구가 진행되었지만 사부는 작은 상처를 입어도 쉽게 그 기능이 상실되기 때문에 식물체보다는 조직배양 세포를 이용하여 유조직 세포로부터 사부를 유도하여 연구되었다 (Aloni 1980). 조직배양 세포를 이용하면 사부에 미치는 당류의 역할 (Cho 1992), 사부의 발달과정의 추적 (Aloni 1980; Cho 1996) 등 식물체에서 연구하기 어려

웠던 부분들을 보다 쉽게 연구할 수 있는 장점이 있다.

유조직 세포로부터 사부가 유도될 때는 세포 내에 축적된 설탕의 농도가 평형을 이룰 때에 가능하며 (Wetmore and Rier 1963), 설탕의 농도와 호르몬 농도의 비율은 사부 형성과 발달에 중요 요인이 될 수 없다는 보고도 있다 (Aloni, 1980).

사부의 구조와 기능 및 그 특성을 이해하기 위해 배추과 식물을 이용하여 유조직의 특성을 지닌 조직배양 세포로부터 사부세포를 유도시켜 사부의 발달과정을 설명하였고 (Cho 1992), 광합성 산물인 설탕이 반세포 (companion cell)에 먼저 수송된 후 반세포로부터 사부세포로 축적되는지에 대하여 그 동안 논란이 되어 왔던 설탕의 축적 메커니즘과 단당류의 축적관계를 (Giaquinta 1979; 1983) 명확히 설명하기 위하여 사부세포를 순수분리하였고, 순수분리한 사부세포에서 설탕은 사부세포로 직접 수송되어 축적됨과 설탕이 사부세포로 축적

\*Corresponding author. Tel 031-220-2482 Fax 031-222-9385

E-mail chobh@mail.suwon.ac.kr

될 때는 운반자-설탕-수소이온 복합체의 메커니즘으로 진행됨을 밝혔고, 순수분리된 반세포는 설탕을 직접 수송시키지 못하였고, 유조직 세포로부터 사부세포로 발달되는 동안 설탕 운반자 유도되었고, 포도당 운반자는 사라짐이 보고되었다 (Cho 1998). 또한 사공영역과 사공이 형성되는 과정이 유조직 세포에서 원형질 연락사가 존재하던 자리에서 유도되는 것만이 아니라, 새로 합성된 세포벽의 융합, 세포질의 존재하는 작은 소포들의 융합으로도 형성됨이 보고되었다 (Cho 2001).

본 연구에서는 현재까지 연구가 이루어지지 않고 있는 사공영역과 사공이 형성되고 발달되는 시기가 사부 발달 과정에 어느 시기와 연관되는지 그리고 사공이 형성되는 양상과 사공의 크기와 특성을 밝히고자 수행하였다. 사부가 유도됨과 동시에 유조직 세포에 존재하던 핵이 분해되므로 (Cho 1992), 사부가 유도되는 과정에서 사공의 형성과 발달과정에 필요한 단백질과 에너지는 새로 합성되거나 생성될 수가 없다. 이런 상황에서 새로 형성되는 사공과 사공의 형성시기에 대한 연구는 사부에 대한 단백질의 관계, 에너지 관계 등에 대한 연구를 계속 수행하는 데 도움이 될 것으로 사료된다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 배양조건

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

### 사부세포의 분리

조직배양 세포 1 g을 소독된 0.9 M sorbitol과 mannitol로 1시간 동안 전처리 후에 해리용 배지 (0.9 M sorbitol과 mannitol + 2 mM CaCl<sub>2</sub> + 0.5 mg/mL BSA + 5 mM 인산나트륨 완충액, pH 6.0) 10 mL에 0.2% macerage (Cal Biochem.) + 0.03% cellulose (Cooper) + 0.02% pectinase (Cooper) + 0.02% rohadmet (Rdehm GmbH)와 protenase 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 leupepsin + 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 사부 원형질체, 반세포 원형질체와 사부와 목부가 함유되어 있었다. 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.

### 전자현미경적 방법과 사공의 크기측정

현탁배양 세포 1 g을 인산 완충액, pH 6.0으로 잘 세척한 후 5% glutar aldehyde로 2시간 고정하였다. 사부원형질체는 효소가 제외된 해리용 용액에 5% glutar aldehyde 가 함유된 용액에서 2시간 고정시킨 후, 인산 나트륨 완충액 pH 6.0으로 3회, 증류수로 2회 세척한 다음 2% OSO<sub>4</sub>로 1시간 30분 처리하였고, 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 이중 염색하였다 (Cho 1988).

사공의 크기와 사공수의 측정은 사부 세포와 해리된 사부 세포를 전자현미경으로 확인한 후 전자현미경의 배율과 측정된 사공의 크기를 단위에 맞추어 환산하였다. 사공의 수는 매번 확인된 사공영역에서 사공의 수를 확인한 후 그 크기를 전자현미경 배율과 단위에 맞추어 환산하였다. 사공의 크기 측정과 사공의 길이 및 두께 측정은 전자현미경 연구를 수회 반복한 결과이다.

## 결과 및 고찰

### 사공영역과 사공의 형성시기

일반적으로 사공영역과 사공은 유조직 세포에서 이미 존재하던 원형질 연락사로부터 유래되는 것으로 알려져 있다 (Lee 등 1999). 그러나 배추과 조직배양 세포에서 유래된 사부에서는 사부가 발달되는 과정에서 새로운 사부 세포벽이 합성될 때 원형질 연락사가 형성되지 않으므로 사부세포와 유조직 세포와의 연결이 차단된다 (Cho 1991). 사공은 원형질 연락사가 없는 장소, 즉 새로 형성된 세포벽을 분해시킨 후 융합되거나 또는 세포질에 존재하는 작은 소포들이 함께

융합되면서 사공영역과 사공을 형성한다 (Cho 2001). 이 때 사공이 형성되면서 유조직 세포의 세포벽에 있는 원형질 연락사와 연결되거나 또는 원형질 연락사가 없던 장소를 분해시켜 유조직 세포벽과 연결되어 사공을 형성한다. 이런 사부 세포들은 원래 식물체의 존재하는 사부와 유사하게 원통형의 모양을 하고 있어서 조직배양 세포로부터 유래된 사부는 식물체의 존재하는 사부와 똑같은 기능을 할 것으로 추측하였다 (Cho 2001). 실제로 순수분리된 사부세포는 설탕을 능동수송하여 사부세포 안에 축적시키나 포도당은 능동수송하지 못하여 조직배양 세포로부터 유래된 사부세포는 식물체의 사부와 그 기능이 일치함을 보였다 (Cho 1998).

조직배양 세포에서 사부의 발달 동안 사공은 어느 시기에 형성되기 시작하며, 사공의 형태와 크기는 일정하지 또한 사부세포들은 같은 수에 사공을 형성하는지 현재까지 밝혀지지 않고 있다. 사부세포에서 사공이 발달하기 시작하면 새로 합성된 사부 세포벽의 일정한 장소에서 분해가 시작됨을 알 수 있었다 (Figure 1, 화살표). 유조직 세포에서 사부세포로 전환되는 동안 새로운 세포벽이 합성되는데 이 시기에 사부세포에만 존재하는 p-protein (phloem protein)이 유도되었다 (Cho 1996). 사부에서 p-protein과 SER은 핵이 분해되면서 세포질에 산재되어 있는 인과 이질 염색질로부터 합성되는데 (Cho 2001), p-preotein과 SER의 합성이 진행되는 중에도 완성된 SER은 세포질과 막으로 되어 있는 부분에 모여졌다. 세포벽의 분해는 p-protein과 SER의 합성이 거의 완료되어 가는 시기인데, 이미 완성된 SER은 새로 합성된 세포벽 주위에 모여져 있어 (세포벽을 에워싸고 있음) 사공을 형성하기 위해서 세포벽이 분해되기 전에 에너지를 제공할 것으로 사료되나 (Figure 2) 아직 그 역할은 분명히 밝히지 못하고 있다. 세포학적인 연구에서 SER의 막과 막 사이에는  $Ca^{2+}$  이온이 조밀하게 모여 있어 막과 막 사이를 연결시키고, SER 막

위에는  $Ca^{2+}$ -ATPase가 분포되어 있어서 에너지 제공과 관련이 있을 것으로 추측하였다 (Hetherington and Trewares 1984). 세포벽 주변에 SER 옆에는 등근 형태의 미토콘드리아들이 모여 있어 세포벽의 분해 또는 사공영역과 사공형성에 필요한 에너지의 일부를 제공하는 것으로 사료되나 더 연구가 진행되어야 할 것이다. 사공은 새로 합성된 세포벽이 분해된 후 유조직 세포벽과 사부 세포벽이 서로 연결되면서 형성되었다. 사공을 정면에서 보면 원통모양에 입체적인 구조를 형성하나 (Cho, 2001), 사공을 측면에서 보면 사부 세포벽과 유조직 세포벽 사이를 가는 실 같은 구조가 연결하고 있었다 (Figure 2). 사공이 형성되면 사공 주위에는 SER이 채워졌다가 육상체 (callose)가 합성되어 사공을 채웠다 (Cho 1992). 그러나 식물체에서는 사공이 열릴 때 육상체가 다시 사라지나 (Essau 1960), 조직배양 세포에서 유도된 사부에서는 육상체사 사라지는 현상을 관찰하기가 어려울 것 같다.

#### 사공영역과 사공의 형태

유조직에서 유도된 사공의 모양은 계란 형태의 모양 (Cho 2001)을 하고 있었다 (Table 1). 사공의 외부크기는 세로  $1.2 \mu m \sim 1.6 \mu m$ , 가로  $0.8 \mu m \sim 1.3 \mu m$  사이의 계란 형태의 다양한 크기로 되어 있었다. 이 결과는 아마도 유조직에서 사부가 형성될 때 사부의 형성시기가 다양하므로 사공의 크기가 다양 할 수 있고, 사부에 따라서 사공의 크기가 다를 수 있다고 사료된다. 사공의 내부크기는 별모양과 유사한 불규칙한 형태이므로 측정이 불가능하였다 (Cho 2001). 사공세포벽의 두께는  $0.05 \mu m \sim 0.07 \mu m$  사이로 가운데는 두껍고 가장자리는 얇게 되어 있었다.  $\mu m^2$ 당 사공의 수는 2개~7개로 다양함



**Figure 1.** The initiation of sieve element area and sieve pore (arrow) in developing phloem cells after 10 days of culture. New cell wall was surrounded by SER. Bar =  $2 \mu m$ . NW, new cell wall; SER, sieve endoplasmic reticulum.



**Figure 2.** Developing sieve element area and sieve pore (arrow) in developing phloem cells after 12 days of culture. The region of sieve pore formation was regular. The completed sieve pores were covered with callose. Middle lamella were shown in the middle of two phloem cells. Tiny threads in sieve pore were interconnected between two phloem cells. Bar =  $2 \mu m$ . SP, sieve pore; C, callose; ML, middle lamella; M, mitochondria.

**Table 1.** Status and size of sieve pore in developing phloem.

Sieve pore	Observation & measurement
Sieve pore form	oval-like
Outer size of sieve pore	1.2 $\mu\text{m}$ ~ 1.6 $\mu\text{m}$ in longitudinal 0.8 $\mu\text{m}$ ~ 1.3 $\mu\text{m}$ in tangential
Number of sieve pore	2 ~ 7 per $\mu\text{m}^2$
Width of sieve pore wall with callos	0.05 $\mu\text{m}$ ~ 0.07 $\mu\text{m}$ in thickness
Inner size of sieve pore	irregular structure of star-like form

The results were achieved by the repeated measurement of a lot of sieve pore in various states of developing phloem.

을 보여 주었다. 이 결과도 사부가 어떤 발달단계에 있는가에 따라서 사공의 수가 다를 수 있다고 사료된다. 사공영역과 사공이 형성되기 전에 SER이 세포벽을 에워싸고 있었고, 사공의 형성 초기에도 SER이 사공에 모여 있는데, SER의 역할을 잘 이해할 수 없으므로 앞으로는 SER의 역할에 대하여 좀더 연구해야 될 것으로 사료된다. 아울러 사부의 발달, 사공영역의 형성과정에 필요한 에너지 문제, 새로 합성되는 단백질(구조 단백질과 효소)의 관한 사항 등에 대하여 더 연구해야 될 부분으로 남아 있다.

**적 요**

*Streptanthus* 조직배양 세포에서 유조직 세포로부터 사부 세포의 발달 동안 설탕 운반자는 유도되었고, 단당류인 포도당의 운반자는 사라졌다 (Cho 1998). *Streptanthus* 조직배양 세포에서 유도된 사부영역과 사공은 sieve endoplasmic reticulum (SER)과 p-protein 합성이 거의 완성되는 시기에 형성되며, SER이 새로 합성된 세포벽을 에워싼 후에 세포벽이 분해되기 시작하였다. 세포벽의 분해와 사공의 형성은 비교적 규칙적으로 진행되었다. 사공의 모양은 계란형이었고, 사공의 외부크기는 세로 1.2  $\mu\text{m}$  ~ 1.6  $\mu\text{m}$ , 가로 0.8  $\mu\text{m}$  ~ 1.3  $\mu\text{m}$ 로 다양하고 사공의 내부크기는 별모양과 유사한 불규칙한 형태였다. 두 사부세포 사이에서 사공의 수는  $\mu\text{m}^2$ 당 2개 ~ 7개였고, 육상체를 포함한 사공벽에 두께는 0.05  $\mu\text{m}$  ~ 0.07  $\mu\text{m}$ 의 두꺼운 벽으로 구성되었다. 사공영역과 사공의 형성에 필요한 에너지는 세포벽 가까이에 위치하고 있는 미토콘드리아에서 얻을 것으로 추측하며, 사공 형성에 대한 SER의 역할은 아직까지 설명할 수 없었다.

**인용문헌**

Aloni R (1980) Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and trachery elements in plant tissue culture. *Planta* **150**:255-263

Cho BH (1987) Analysis of the two affinity system of the uptake of fructose in suspension culture. *Kor J Bot* **30**:277-285

Cho BH (1988) Effects of 2,4-D on phloem formation and differentiation of *Streptanthus* cells in suspension culture. *Kor J Plant Tissue Culture* **15**:217-223

Cho BH (1991) Structural consideration of the translocation and the mechanism of phloem loading of *Streptanthus* cells in suspension culture. *Kor J Plant Tissue Culture* **19**:89-93

Cho BH (1992) The role of sugar on phloem formation in *Streptanthus* suspension culture cells. *Kor J Plant Tissue Culture* **19**:205-208

Cho BH (1996) Phloem differentiation of cell culture of *Streptanthus tortus* *Kor J Plant Tissue Culture* **23**:107-111

Cho BH (1998) Isolation of phloem cell and active transport of sucrose by isolated phloem and parenchyma cells of *Streptanthus tortus* suspension culture. *Kor J Plant Tissue Culture* **25**:7-11

Cho BH (2001) Formation of sieve element area and sieve pore in suspension cultures of *Streptanthus tortus*. *Kor J Plant Tissue Culture* **28**:109-112

Essau K (1960) Phloem In : Essau K, (ed), *Anatomy of seed plants*, Ed2, John Wiley and Sons, New York, pp 157-180

Giaquinta R (1979) Phloem loading of sucrose. *Plant Physiol* **63**:744-748

Giaquinta R (1983) Phloem loading of sucrose. *Annu Rev Plant Physiol* **34**:347-387

Hetherington A, Trewares A (1984) Activation of a pea membrane protein kinase by calcium ions. *Planta* **161**:109-117

Murashige RD, Skoog E (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497

Wetmore R, Rier J (1963) Experimental induction of vascular tissue in callus of angiosperms. *Amer J Bot* **50**:418-430

이재두, 소용영, 김윤식, 김준철, 방재욱, 차현철, 홍성식, 홍정희 (1999) Phloem. In : 주성익, (ed), *식물형태학*, Ed5, 아카데미서적, pp 79-92