

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 種子の 胚發達에 따른 胚乳의 構造變化 및 組織化學的 研究

劉成哲 · 金宇甲

高麗大學校 理科學 生物學科

(1992년 3월 19일 접수)

Structural Changes and Histochemical Study of Endosperm on *Panax ginseng* C.A. Meyer during Embryo Development

Seong-Cheol Yu and Woo-Kap Kim

Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received March 19, 1992)

Abstract □ Structural changes of the endosperm of *Panax ginseng* C.A. Meyer from fertilization to germination were investigated by light microscope. The endosperm of the ginseng seed is cellular type. Since endosperm cells adjacent embryo continuously breakdown and disappear with the elongation of embryo, the real of endosperm is gradually decreased. As the anatropous ovules of immature seed with green seed coat develops more and more, ovary cells adjacent ovary cavity become abundant by the periclinal division, their size is decreased, hypotrophy of cell wall discern, and they are gradually differentiated in seed coat. Though embryo responds strongly to basic dye at the stage of completion of endosperm formation, tissue of endosperm responds to acidic dye positively. Cell wall of embryo and endosperm are composed of primary cell wall not lignified. Endosperm cells adjacent embryo begin to breakdown in the endosperm tissue of indehiscent seed before the beginning of the after-ripening. Dehiscent seed of which seed coat is opened through after-ripening represent the form as a seedling in the result of embryo developments with the formation of organs; radicle, cotyledon, plumule. Umbiliform layer represents strong positive response to the toluidine blue and the basic fuchsin. Umbiliform layer that endosperm cells breakdown and disappear is observed clearly at the periphery of the embryo cotyledon, while slightly at the periphery of the radicle.

Keywords □ *Panax ginseng*, structure, histochemistry, endosperm, seed

서 론

種子形成은 수정 직후부터 시작하여 胚珠, 胚囊, 胚乳 및 胚의 성장과 분화 등은 서로 연관된 일련의 과정에 의해 진행되며, 胚乳의 형성 및 저장물질의 축적, 胚의 성숙과정 등이 수반된다. 胚乳는 極核과 精核이 胚囊中央細胞에서 결합하여 형성되는 1차 胚乳核의 반복된 분열에 의하여 형성되어, 胚의 성장에 필요한 영양물질의 합성 및 저장기능을 수행한다.^{1,2)}

수정후, 종자내 胚乳細胞의 발달 초기과정에 관한 연구들은 주로 곡물류를 대상으로 종자의 성숙과정 중에 합성되는 저장단백질에 주안점을 두어 연구되어 이들의 저장기관인 蛋白顆粒(protein body)의 형성 및 유형 등이 확인되었다.

피자식물의 胚乳形成은 核型(nuclear type), 細胞型(cellular type), 沼生族型(helobial type) 등의 3가지 유형으로 나뉘어지는데,²⁾ 1차 胚乳核의 분열 및 세포벽형성의 양상에 따라 구분되고 있다.³⁻⁶⁾

胚乳細胞에 나타나는 단일막에 둘러싸인 蛋白顆粒은 동질성 기질을 가지며 crystalloid와 globoid가 매몰되어 있고 가수분해효소, lectins, phytin 등이 존재한다. 또한, 종자의 성숙 및 발아과정에 있어 胚의 지속적인 발달은 胚乳細胞內 저장물질의 분해로써 이루어지며, 저장단백질의 분해는 蛋白顆粒이 액포로의 융합에 의하여 수행된다.⁷⁾ 이러한 저장물질의 분해는 곧 胚乳의 퇴행과정인 것으로 알려져 왔다.^{8,9)}

人蔘 種子에 대한 연구는 광학현미경을 이용한 胚發生에 관한 연구가 부분적으로 이루어졌고,^{10,11)} 전자현미경을 이용한 성숙종자의 미세구조 및 효소분포,^{12,13)} 種皮의 구조 및 분화과정,¹⁴⁾ 胚囊形成,¹⁵⁾ 종자형성에 따른 胚乳細胞의 미세구조 변화상 및 저장물질의 형성,¹⁶⁻¹⁸⁾ 그리고 胚乳의 주요 저장단백질에 대한 면역세포화학적 연구¹⁹⁾ 등이 부분적으로 수행되어 왔으나, 종자 형성과 후숙과정에 있어서 胚乳의 형성 및 발달에 따른 구조변화상을 종합적으로 수행한 연구보고는 없다.

따라서, 본 연구는 수경후로부터 발아 직전까지, 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 종자 형성과 후숙과정에 있어서 胚發達에 따른 胚乳의 구조변화상을 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

강화도산 4년생 人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer)을 지상부가 나오기 전인 4월 초에 실험실의 화분에 이식한 후, 인공수정시킨 종자 또는 삼포로 출장하여 채취한 종자를 녹색종자, 홍숙종자, 미개갑 종자, 후숙과정을 거친 개갑종자와 발아직전 개갑종자 등으로 구분한 뒤, 해부현미경 하에서 胚를 포함한 胚乳組織을 적출하여, 이를 각각 공시재료로 사용하였다.

2. 실험방법

胚를 포함한 胚乳組織을 FAA, neutral formalin, carnoy액 등에 고정하고 알코올로 탈수한 후 paraffin에 포매하였다. 포매된 시료는 rotary microtome (American Optical Co.)으로 7~10 μm의 연속절편을 제작하여 alcian blue-Schiff's reagent(PAS)-hematoxylin, crystal violet, iron hematoxylin-orange G, safranin-fast green, Schiff's reagent(PAS)-light green 등으로 염색하였고, 조직의 일부는 2.5% phosphate

buffered paraformaldehyde-glutaraldehyde(pH 6.8) 용액으로 1시간 전고정한 후, 동일한 완충액으로 세척시킨 다음, 1% phosphate buffered osmium tetroxide(pH 6.8)에서 1시간 후 고정시켰다. 동일한 완충액으로 세척한 재료는 ethanol 탈수과정을 거쳐 propylene oxide로 치환한 후, Epon 혼합액과 Spurr low viscosity resin에 포매하였다. 포매된 재료는 LKB-V型 ultramicrotome으로 1 μm 두께의 절편을 제작한 후, methylene blue나 methylene blue-basic fuchsin 혹은 toluidine blue로 염색하여 광학현미경(Nikon APOPHOT)으로 관찰하였다.

결 과

5단계로 구분된 종자의 크기를 측정해 본 결과, 녹색 종자 胚乳의 장축의 길이는 2.0~4.5 mm, 胚의 장축의 길이는 140~250 μm이었다. 또한, 홍숙 종자 胚乳의 장축의 길이는 5.0~5.5 mm, 胚의 장축의 길이는 250~350 μm이었으며, 그 이후 단계의 胚乳의 길이는 큰 차이가 없었다. 미개갑 종자 胚의 장축의 길이는 350 μm~1.5 mm 이었고, 개갑종자 胚의 장축의 길이는 3.0 mm~4.0 mm이었으며, 발아 직전 개갑 종자 胚의 장축의 길이는 4.0~4.5 mm 이었다.

인삼의 자에는 2心皮 4胚珠로 이루어져 있으며, 하나의 心皮에는 2개의 胚珠가 존재한다. 直生胚珠는 점진적으로 퇴화하지만 倒生胚珠는 계속 성장해서 胚囊을 형성한다.¹⁵⁾

녹색 종자에 있어서 倒生胚珠가 발달하여 胚囊이 형성되었을 시기에는 두 心皮사이의 중앙부분에 큰 공간이 존재하였다(Fig. 1). 胚珠가 더욱 발달하면서 子房腔에 떠난 子房壁細胞들은 병충분열로 그 수가 증가되었지만 크기는 작아지고 세포벽의 비후도 뚜렷하였다(Fig. 2). 胚囊中央細胞의 極核과 精核이 결합하여 형성되는 胚乳細胞는 연속적인 세포분열 결과 細胞型 胚乳를 형성하였으며(Fig. 3), iron hematoxylin-orange G와 alcian blue-Schiff's reagent(PAS)-hematoxylin 등으로 염색을 실시한 결과, 內皮는 hematoxylin과 PAS에, 胚乳細胞는 orange G와 alcian blue에 각각 염색반응을 나타내었다(Fig. 3, 4). 아울러 珠皮로부터 분화된 內皮는 胚乳細胞가 분화됨에 따라 퇴행성 변화와 더불어 세포층 수도 감소되었다(Fig.

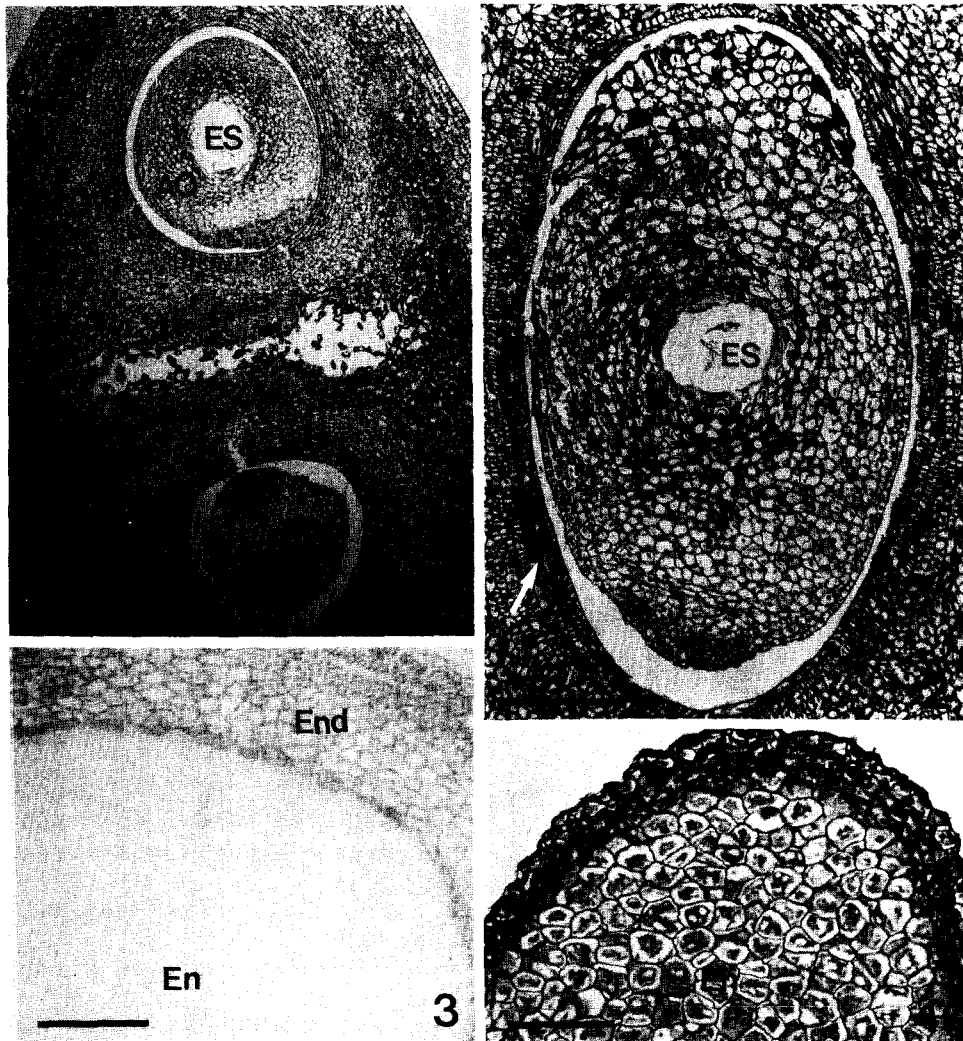


Fig. 1-14. Light micrographs of ginseng seed. Bar=200 μm.

Fig. 1, 2. An immature seed shows two anatropous ovules(AO) and embryo sac(ES) at early stage of seed development. Arrow indicates six to seven layers of cells being differentiated into ovary wall(OW).

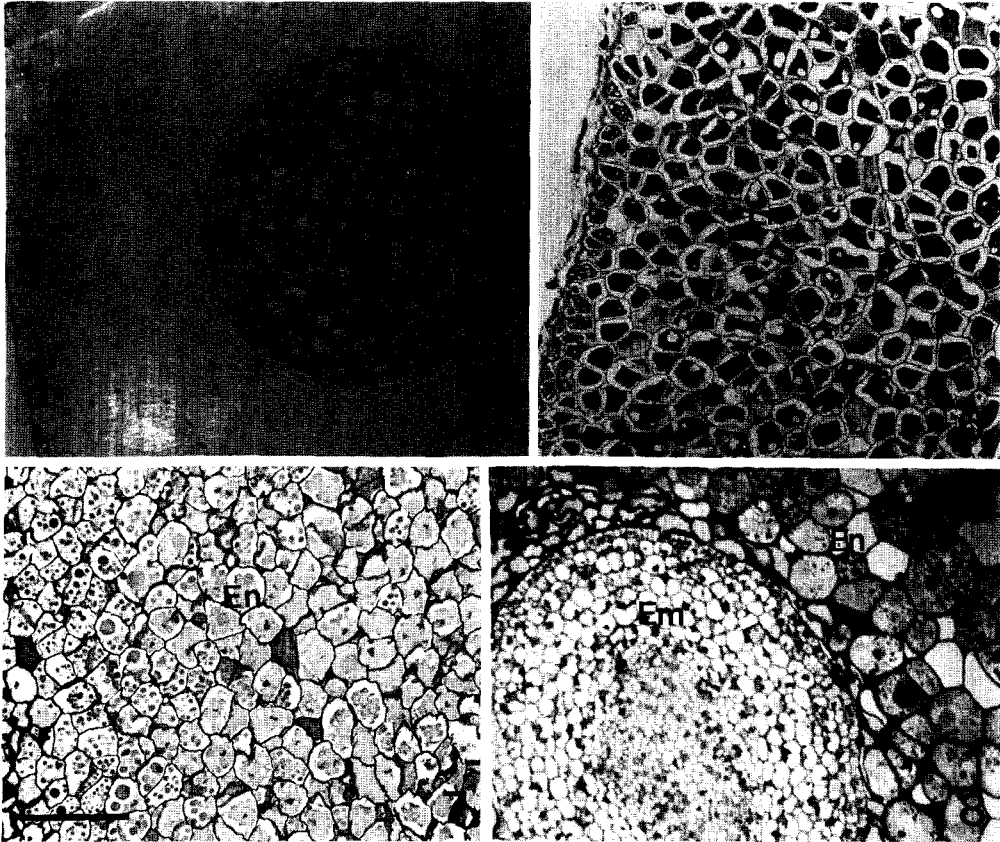
Fig. 3. Endothelium(End) derived from integuments has 10~15 cell layers at early stage and endosperm(En) cells have become of active cell divisions.

Fig. 4. Endosperm cells are highly vacuolated cells and have distinct cell wall. Endothelium has 4 to 5 cell layer and shows degenerating cytoplasm.

4).

대부분의 内皮 세포층이 퇴화, 소실된 시기의 胚와 胚乳組織은 crystal violet을 염색시킨 결과, 胚乳組織은 거의 반응하지 않았으나, 胚乳細胞内の 核과 胚는 강한 염색반응을 나타내었고, 특징적으로 胚의 세포에 큰 액포가 관찰되었다(Fig. 5). 한편, safranin-fast

green 염색을 실시한 胚乳組織은 Fig. 5와는 달리 fast green에 강한 염색반응을 나타냈으며, 바깥쪽 胚乳細胞의 세포벽은 다소의 safranin 반응을 나타내었고, 안쪽의 胚乳細胞들에 비해 비교적 세포질이 충실하였으며, 점진적으로 胚乳의 바깥쪽 세포로부터 蛋白顆粒이 형성되었다(Fig. 6).



- Fig. 5.** A lot of vacuoles are characteristically observed in the embryonic cells with positive reaction of crystal violet comparing endosperm cells with negative reaction.
- Fig. 6.** Positive reactions of safranin and fast green staining appeared on the endosperm cells. Outer cells of endosperm are filled with the protein bodies.
- Fig. 7.** Protein bodies at the outer region of endosperm showing globular shape comparing irregular shape at the inner regions at the stage of ripened of seed.
- Fig. 8.** Umbiliform layer contacted with radicle of embryo showed positive reaction of basic fuchsin and protein body of endosperm showed high stainability with methylene blue. Em; embryo, En; endosperm, UL; umbiliform layer.

홍숙 종자의 胚乳細胞는 蛋白顆粒으로 가득차 있었으며, 이들은 바깥쪽 胚乳細胞에서 전형적인 구형의 형태를 이루었지만, 안쪽 胚乳細胞에서는 무정형을 이루고 있었다(Fig. 7).

미개갑 종자의 胚乳組織은 methylene blue와 basic fuchsin으로 염색시킨 결과, 胚乳細胞의 蛋白顆粒은 methylene blue에, 세포벽은 basic fuchsin에 양성반응을 나타내었으며, 幼根 주변부에 위치한 제형층은 발달이 미약하였고, 염색성도 낮았다(Fig. 8). 반면에 子葉 상단부의 주변에 위치한 제형층은 발달되어 간격이 확장되었으나 염색성은 낮았다. 또한 胚乳細胞

들은 염색성이 강한 세포들과 염색성이 약한 세포들로 구분되었다(Fig. 9).

후숙과정을 거쳐 種皮가 열개된 개갑종자와 발아 직전 개갑종자에서 子葉과 幼芽가 발달한 胚와 인접한 胚乳細胞들은 점차 그 형태를 소실하면서 제형층을 이루었으며, 이들은 toluidine blue에 강한 염색반응을 나타내었다(Fig. 10, 12). 이 시기로부터 胚는 매우 발달하여 유식물의 기관분화가 뚜렷하였으며, 胚의 주변부에 위치한 제형층은 basic fuchsin에 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 11). 배유세포내 蛋白顆粒은 구조의 변화가 뚜렷하여 바깥쪽 胚乳細胞의 蛋白顆

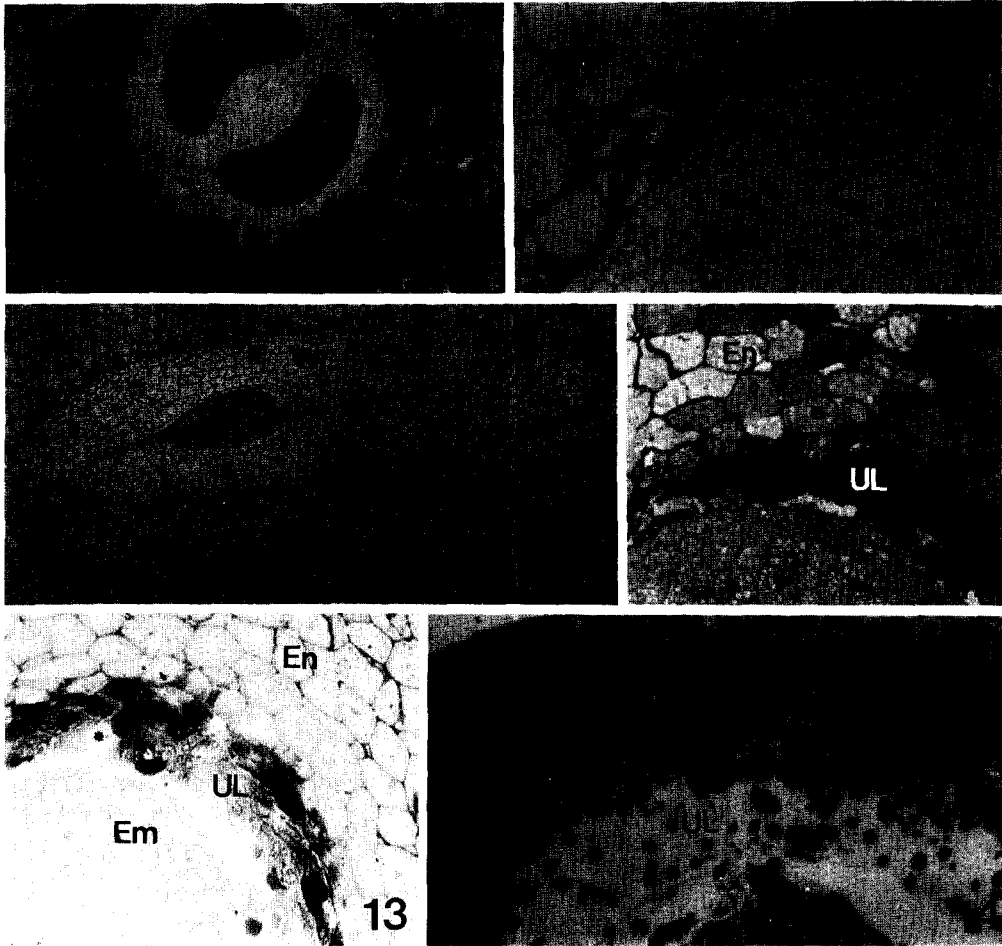


Fig. 9, 10. Two kinds of endosperm cells according to the stainability of protein bodies with methylene blue and basic fuchsin can be distinguished at the stage of indehiscent seed. Note the umbiliform layer between the embryo composed of cotyledon and plumule and degenerated endosperm cells.
Fig. 11. Completely differentiated embryo with 3.0~3.5 mm in length at the stage just before germination is consisted of cotyledon and plumule.
Fig. 12. Umbiliform layer, between embryo and endosperm, composed of degenerated cell components of endosperm cells shows highly positive reaction on toluidine blue stain.
Fig. 13, 14. Protein bodies of endosperm cells are undegradated in the outer layers of endosperm cell, but are degraded in the inner layers. Endosperm cells near the umbiliform layer are lysed. Cell debris and inclusions are accumulated in umbiliform layer. Cot; cotyledon, Em; embryo, En; endosperm, Pl; plumule, UL; umbiliform layer.

粒은 비교적 그 형태를 유지하고 있었으나, 胚쪽에 가까운 세포들의 蛋白顆粒은 다소 변화된 형태를 나타내었다. 특히 제형층과 인접한 胚乳細胞의 蛋白顆粒은 형태가 매우 불규칙하였고, 염색성 또한 점차 낮아지고 있었다(Fig. 12). 胚와 胚乳사이의 제형층은

胚의 발달과 더불어 간격이 점차 확장되었으며, 이들은 세포의 분해, 소실양상이 현저하여 蛋白顆粒과 지질과립뿐만 아니라 세포벽도 일부 분해된 다수의 무정형 세포와 이들의 잔유물로 구성되어 있었다(Fig. 13, 14).

고 찰

인삼의 초기 녹색 종자는 胚의 장축의 길이가 140~250 μm 이었고, 胚乳의 장축의 길이가 2.0~4.5 mm이었다. 이후 후숙과정을 거치는 동안 胚는 계속 성장하여 발아 직전 개갑 종자의 胚는 그 크기가 4.0~4.5 mm로서 약 20배 가까이 신장하였지만, 胚乳는 외관상 그 크기의 변화를 나타내지 않았다. 본 연구 결과에 의하면 이와 같은 胚의 신장과 아울러 胚와 인접한 胚乳細胞들은 계속적으로 분해, 소실되어 실제 胚乳의 크기는 점진적으로 감소하였다. 이러한 사실은 이들 분해된 胚乳細胞들이 胚가 신장할 수 있도록 공간을 제공할 뿐만 아니라, 胚의 발달에 있어 필수적인 양분공급의 역할을 함께하고 있음을 보여주는 것이다.

녹색 종자는 倒生胚珠가 발달하여 胚囊이 형성되었을 시기에 Fig. 1과 같이 두 心皮 사이의 중앙부분에 큰 공간이 존재하였다. 이것은 胚珠의 발달과 함께 두 心皮의 확장에 따른 子房壁 파괴의 필연적인 결과로 사료된다. 한편, 胚珠가 더욱 발달하면서 子房腔에 면한 子房壁細胞들은 병충분열로 그 수가 증가되지만 그 크기는 작아지고 세포벽의 비후는 더욱 뚜렷하였으며(Fig. 2), 이들은 점진적으로 種皮로 분화된다.

피자식물의 胚乳形成은 核型, 細胞型, 沼生族型 등의 3가지 유형으로 구분된다.²⁾ 核型 胚乳의 특징은 세포벽이 형성되지 않은 상태에서 1차 胚乳核의 계속된 분열로 多核細胞를 형성하거나, 또는 그 후에 세포벽을 형성한다. 또한, 胚乳細胞의 核은 계속된 분열과 더불어 胚囊의 주변부로 밀려나고, 대신 세포의 중앙부는 큰 액포가 나타난다.⁶⁾ 細胞型 胚乳는 일반적으로 胚乳의 생장이 끝날 때 까지 핵 분열과 함께 세포벽형성을 계속한다.

Sedgley⁵⁾는 細胞型 胚乳인 avocado를 대상으로 한 실험에서 1차 胚乳核의 첫 분열 이후에 胚囊의 한쪽 끝에서 다른 쪽 끝으로 세포벽이 발달한다고 보고하였다. Swamy와 Parameswaran,³⁾ Swamy와 Krishnamurthy 등⁴⁾은 대부분의 단자엽식물에서 볼 수 있는 沼生族型 胚乳는 1차 胚乳細胞의 불균등 분열로 생긴 珠孔部の 큰 세포가 유리핵분열과 더불어 세포벽을 형성하지만, 合點部の 작은 세포는 세포벽 형성을 수반하지 않는 핵분열만을 수행하는 특징을 갖는다고

하였다.

인삼 종자의 胚乳는 Fig. 3과 같이 Esau²⁾의 보고와 일치하는 細胞型으로 형성되었다.

녹색 종자에 있어 胚乳形成이 완료되었을 시기에, 胚와 胚乳組織에 다양한 염색반응을 시킨 결과, 胚는 crystal violet, hematoxylin, PAS 등과 같은 염기성 염료에 강한 반응을 나타냈으나(Fig. 5, 6), 胚乳組織은 fast green, light green, orange G 등과 같은 산성 염료에 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 5, 6, 7). 이러한 사실은 胚의 세포는 핵을 비롯한 산성물질의 함량이, 胚乳組織은 염기성 단백질과 염기성물질의 함량이 높다는 사실을 간접적으로 나타내는 것이었다. 또한, safranin-fast green 염색반응을 실시한 결과 바깥쪽 胚乳細胞를 제외한 대부분의 胚와 胚乳細胞의 세포벽은 safranin에 염색반응을 나타내지 않았다(Fig. 7, 8). 이것은 이들 세포벽이 목질화되지 않은 일차벽으로 구성되어 있음을 나타내는 것이었다.

미개갑 종자의 胚乳組織에 있어 methylene blue의 염색상은 바깥쪽 胚乳細胞는 강한 양성반응을 나타냈으나, 안쪽의 胚乳細胞는 점진적으로 낮아지는 결과를 얻었는 바, 이는 종자의 후숙과정이 시작되기 전에 이미 胚와 인접한 胚乳細胞의 분해가 시작되고 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

인삼 종자는 결실한 홍숙종자를 채종하였을 때에는 胚가 미성숙 상태이므로 채종후 인위적으로 胚의 성숙을 촉진, 種皮를 열개하는 후숙과정을 거쳐야하는 특수성을 지니고 있다.

본 연구에서도 후숙과정을 거쳐 種皮가 열개된 개갑종자에서는 胚의 발달이 현저히 진행됨에 따라 幼根, 子葉, 幼芽 등의 기관형성과 함께 유식물체로서의 형태를 갖추고 있다.

Brown과 Morris,⁸⁾ Dwarthe와 Ashford 등⁹⁾은 胚와 胚乳사이의 점액층을 depleted layer라고 지칭하였다. Kim¹³⁾은 배성숙 과정 또는 발아과정에 있어 영양원의 공급이 depleted layer와 인접한 胚乳細胞의 점진적인 자가분해에 의하여 이루어지며, 이들 분해물질은 depleted layer를 거쳐 胚에 이동된다고 하여 이 depleted layer를 제형층(umbiliform layer)이라고 명명하였다.

본 연구에서, 제형층은 toluidine blue 염색반응에 강한 양성반응을 나타냈다. 이러한 사실은 胚乳細胞의 분해과정이 진행되면서 이들 세포에 축적되었던 염기성 단백질이 점차 분해됨으로써 胚乳細胞는 산성을

나타내고, 분해과정이 완전히 이루어진 제형층은 대부분이 산성물질로 구성되고 있음을 보여주는 것이었다. 또한, 胚乳細胞의 분해, 소실이 이루어진 제형층은 胚의 子葉 주변부에서 뚜렷하였고, 幼根 주변부에서는 미약하였다. 이것은 胚의 성장이 자엽부위 쪽으로 이루어지며, 저장양분의 흡수도 이곳에서 집중적으로 이루어지고 있다는 사실을 암시하는 것이었다.

요 약

수정 직후로부터 발아 직전까지 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 胚乳의 구조 변화상을 광학현미경을 이용하여 규명하였다.

인삼 종자의 胚乳는 細胞型이었으며, 胚의 신장과 아울러 胚와 연결한 胚乳細胞들은 계속적으로 분해, 소실되어 실제 胚乳의 크기는 점진적으로 감소하였다.

녹색 종자는 倒生胚珠가 더욱 발달하면서 子房腔에 면한 子房壁細胞들은 병충분열로 그 수가 증가되지만 그 크기는 작아지고 세포벽의 비후는 더욱 뚜렷하였으며, 이들은 점진적으로 種皮로 분화된다. 胚乳形成이 완료되었을 시기에, 胚는 염기성 염료에 강한 반응을 나타냈으나, 胚乳組織은 산성염료에 강한 양성 반응을 나타내었다. 胚와 胚乳細胞의 세포벽은 목질화되지 않은 일차벽으로 구성되어 있었다.

미개갑 종자의 胚乳組織에 있어 종자의 후숙과정이 시작되기 전에 이미 胚와 인접한 胚乳細胞의 분해가 시작되고 있었다.

후숙과정을 거쳐 種皮가 열개된 개갑종자에서는 胚의 발달이 현저히 진행됨에 따라 幼根, 子葉, 幼芽 등의 기관형성과 함께 유식물체로서의 형태를 갖추고 있었다. 제형층은 toluidine blue와 basic fuchsin에 강한 양성반응을 나타냈다. 또한, 胚乳細胞의 분해, 소실로 이루어진 제형층은 胚의 子葉 주변부에서 뚜렷하였고, 幼根 주변부에서는 미약하였다.

인용문헌

1. Dure, L.S.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 259 (1975).
2. Esau, K.: *Anatomy of Seed Plant*, John, Wiley & Sons, New York, p. 550 (1977).
3. Swamy, B.G.L. and Parameswaran, N.: *Bio. Rev.*, **38**, 1 (1963).
4. Swamy, B.G.L. and Krishnamurthy, K.V.: *Phytomorphology*, **23**, 74 (1973).
5. Sedgley, M.: *Ann. Bot.*, **44**, 353 (1979).
6. Bhatnagar, S.P. and Sawhney, V.: *Int. Rev. Cytology*, **73**, 55 (1981).
7. Weber, E. and Neumann, D.: *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **175**, 279 (1980).
8. Brown, H.T. and Morris, G.H.: *J. Chem. Soc. Trans.*, **57**, 458 (1980).
9. Dwart, D. and Ashford, A.E.: *Bot. Gaz.*, **143**, 164 (1982).
10. Harn, C.Y. and Hwang, J.K.: *Commemoration Theses of Chon-Puk Univ.*, **5**, 293 (1963).
11. Hwang, J.K.: *Commemortion Theses of Chon-Puk Univ.*, **8**, 5 (1966).
12. Kim, W.K., Park, H.D., Kim, E.S. and Han, S.S.: *Korean J. Electron Microscopy*, **9**, 57 (1979).
13. Kim, W.K.: *Korean J. Electron Microscopy*, **14**, 15 (1984).
14. Kim, W.K., Kim, E.S. and Jeong, B.K.: *Korean J. Bot.*, **29**, 295 (1986).
15. Kim, E.S. and Kim, W.K.: *Korean J. Electron Microscopy*, **16**, 14 (1986).
16. Yu, S.C., Jeong, B.K. and Kim, W.K.: *Korean J. Electron Microscopy*, **18**, 141 (1988).
17. Yu, S.C. and Kim, W.K.: *Korean J. Bot.*, **34**, 201 (1991).
18. Yu, S.C., Chae, E.J. and Kim, W.K.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **15**, 131 (1991).
19. Kim, W.K.: *Korean J. Electron. Microscopy*, **19**, 74 (1989).