

人蔘 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 種子の 후숙에 따른 胚乳細胞의 微細構造 變化

劉 成 哲 · 李 昌 燮 · 金 宇 甲
(高麗大學校 理科學 生物學科)

Ultrastructural Changes of Endosperm Cells in Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Seeds during After-Ripening

Yu, Seong Cheol, Chang Seob Lee and Woo Kap Kim
(Department of Biology, Korea University, Seoul)

ABSTRACT

This study has been carried out to investigate the ultrastructural changes in the associated with the disintegration of the storage materials in endosperm cell of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) seed during after-ripening with light and electron microscope.

The protein body of endosperm cells near the umbiliform layer showed various degenerative patterns, and so electron density of proteinaceous matrix was gradually decreased during after-ripening. These results indicate that the decomposition of endosperm was already initiated during after-ripening.

As the degeneration of endosperm was more progressed after the dehiscence of seed, non-decomposed part of protein body appeared amorphyously with high electron density. Decomposed protein bodies were vacuolized with the loss of their matrix and gradually expanded by fusion. Also, spherosomes were gradually dissolved with the lowered electron density during the degeneration of endosperm. The vesicles of dictyosomes near the cell wall are observed in endosperm contacting with umbiliform layer and are fused with plasma membrane. Umbiliform layer which was the complex of the decomposed remnants of lysis and materials has strong stainability for toluidine blue and basic fuchsin.

緒 論

受精 직후 有胚乳 種子の 형성과정에서 胚의 發生이 시작되며, 胚乳의 形成 및 저장물질의 축적과정 등이 수반된다. 胚乳는 胚의 성장에 필요한 영양물질의 저장기능을 수행한다(Esau, 1977).

種子の 성숙과정에서, 胚乳細胞에 출현하는 蛋白質顆粒 (protein body) 과 지질소구인 스페로솜(spherosome)은 발아 이전에 여러가지 효소의 작용으로 분해되어 胚의 성장에 필요한 에너지원으로 쓰이는 것으로 알려져 왔다 (Breidnbach and Beevers, 1967). 또한, 胚의 지속적인 발달은 胚乳細胞內 저장물질의 분해로써 이루어지며, 이러한 분해는 곧 胚乳의 퇴행과정인 것으로 알려져 왔다

(Harris and Chrispeels, 1975; Ashton, 1976; Pernollet, 1978; Jacobsen *et al.*, 1979; Kim *et al.*, 1976b; Brown and Morris, 1980; Van der Wilden and Herman, 1980; herman *et al.*, 1981; Okamoto *et al.*, 1982).

人蔘 種子에 대한 연구는 成熟 種子の 미세구조 및 효소 분포(Kim *et al.*, 1979; Kim, 1984), 종자형성에 따른 배유세포의 미세구조 변화상 및 저장물질의 형성(Yu *et al.*, 1988; Yu and Kim, 1991; Yu *et al.*, 1991), 胚乳의 주요 저장단백질에 대한 번역세포화학적 연구(Kim, 1989) 등이 수행되어 왔으나 종자의 후숙 및 발아에 따른 種子內 저장물질의 분해를 포함한 胚乳細胞의 구조적인 변화과정에 대한 연구보고는 없다.

따라서, 본 연구는 人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer)

種子の 개갑 후로부터 發芽 직전까지의 後熟과정에 있어서 胚乳의 퇴행에 따른 미세구조 변화상과 저장 단백질과 지질의 저장부위인 蛋白質顆粒 및 스페로솜의 분해양상을 밝히는데 그 목적이 있다.

材料 및 方法

實驗 材料. 강화도産 4년생 人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 채종 후 과육을 제거한 종자를 2일간 음건시킨 후, 종자와 모래를 1:5의 비율로 혼합한 일반적인 지상부 설치법으로 후숙과정을 거친 개갑종자 및 발아직전 개갑종자를 해부 현미경 하에서 胚를 포함한 胚乳組織을 적출하고, 이를 각각 실험재료로 사용하였다.

實驗 方法. 胚를 포함한 胚乳 소편을 2.5% phosphate buffered glutaraldehyde(pH 6.8) 용액에서 1시간 전고정하여 동일한 완충액으로 세척시킨 다음, 1% phosphate buffered osmium tetroxide(pH 6.8)에서 1시간 후고정시켰다. 동일한 완충액으로 세척한 재료는 ethanol-acetone 탈수과정을 거쳐 Epon 혼합액과 Spurr's low viscosity medium에 包埋하였다. 包埋된 재료는 LKB-V型 ultramicrotome으로 1 μ m 두께의 절편을 제작한 후, methylene blue나 methylene blue-basic fuchsin, 혹은 toluidine blue로 염색하여 光學顯微鏡(Nikon APOPHOT)으로 관찰하였다. 동일한 부위에서 은색절편을 제작하여 copper grid(200 mesh)에 부착시킨 다음, 1% uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후, 透過電子顯微鏡(JEM 100 CX-II, 80 kV)으로 관찰하였다.

結 果

光學顯微鏡的 觀察. 개갑종자의 배유의 장축의 길이는 5.0~5.5 mm로서 후숙이전 단계의 배유의 길이와 큰 차이가 없었다. 개갑종자 胚의 장축의 길이는 3.3~4.0 mm이었으며, 발아 직전 개갑종자 胚의 장축의 길이는 4.0~4.5 mm이었다.

개갑종자의 胚乳細胞內 蛋白質顆粒은 구조의 변화가 뚜렷하여 바깥쪽 胚乳細胞의 蛋白質顆粒은 비교적 그 형태를 유지하고 있었으나, 胚 쪽에 가까운 세포들의 蛋白質顆粒은 다소 변화된 형태를 나타내었다(Plate I-1). 특히 제형층과 인접한 胚乳細胞의 蛋白質顆粒은 형태가 매우 불규칙하였고, 염색성 또한 점차 낮아지고 있었다(Plate I-2). 이 시기에 있어서 胚의 子葉 주변부에 위치한 제형층은 잘 발달되었으며, basic fuchsin에 강한 양성반응을 나타냈으나(Plate I-3), 유근 주변부에 위치한 제형층은 발달이 미약하였고, 염색성도 낮았다(Plate I-4).

발아 직전 개갑종자의 胚는 매우 발달하여 子葉과 幼芽

등이 분화된 전형적인 胚를 이루고 있었다(Plate II-1). 胚와 胚乳사이의 제형층은 胚의 발달과 더불어 간격이 점차 확장되었다(Plate II-2). 이들은 세포의 분해, 소실양상이 현저하여 蛋白質顆粒 뿐 만 아니라 세포벽도 일부 분해된 다수의 무정형 세포와 이들의 잔유물로 구성되어 있었다(Plate II-2, 3).

電子顯微鏡的 觀察. 종피가 열개된 후 성장중인 胚는 이미 幼根, 幼芽, 子葉 등으로 구분되었고, 핵과 구형의 액포가 세포의 대부분을 차지하고 있었다. 또한, 미토콘드리아, 소포체 등 세포내 소기관들이 형성되었고, 구형의 스페로솜은 세포벽과 인접하여 위치하였다. 인접한 제형층은 蛋白質顆粒의 분해산물인 점액성 물질이 유입되었고, lipid body는 胚의 세포벽과 인접하여 위치하였다(Plate III-1). 胚乳細胞內의 蛋白質顆粒은 분해가 진행되어 전자밀도가 낮게 관찰되는 등 다양한 분해양상을 보였으나, 한계막은 유지하고 있었다(Plate III-2).

발아 직전 개갑 종자의 胚乳細胞內 단백질성 분해산물들은 융합되었으며, 점진적으로 크기가 감소되었다(Plate III-2, 3). 蛋白質顆粒이 위치했던 주변부는 구형과 세장형의 미토콘드리아가 분포하였으며, 막성구조물이 관찰되었다(Plate III-4). 胚乳細胞의 퇴행과정이 진행됨에 따라 蛋白質顆粒은 서로 융합하여 결과적으로 액포로 대체되었고, 액포는 서로 융합하여 확장되었다(Plate III-5, 8). 胚乳細胞의 액포화가 진행되는 동안 미소체와 미토콘드리아는 세포벽과 인접하여 위치하였다(Plate III-4, 8). 스페로솜은 모양이 불규칙하였고, 점진적으로 감소하거나(Plate III-3, 4), 막의 내부에 구획이 나누어지는 등 분해양상을 보였다(Plate III-3, 5). 한편, 스페로솜은 막 주변부로부터 분해되어 점차 액포와 융합하였다(Plate III-8). 디티오솜 유래의 소포들은 제형층과 접한 胚乳細胞壁과 인접하여 위치하였다(Plate III-6, 7). 또한, 다수의 디티오솜 소포들은 방출되어 원형질막과 융합하였다(Plate III-6). 제형층과 면한 胚乳細胞壁은 지속적으로 분해되어 침유상을 이루었고, 결과적으로 세포벽은 얇아졌다(Plate III-4, 6). 원형질막을 따라 위치한 전자밀도가 낮거나 높은 소포들은 원형질막과 융합하였고, 전자밀도가 높은 무정형의 과립은 원형질막 쪽으로 이동하였다(Plate III-5, 8).

考 察

人蔘 종자는 후숙과정 동안 계속적으로 胚가 신장하였지만, 胚乳는 외관상 그 크기의 변화를 나타내지 않았다. 본 연구 결과에 의하면 이와 같은 胚의 신장과 아울러 胚와 연결한 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 함께 하고 있음을 보여주는 것이었다.

Brown과 Morris(1980), Dwart과 Ashford(1982) 등은 胚와 胚乳사이의 접맥층을 depleted layer라고 지칭하였다. Kim(1984)은 胚 성숙과정 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 이들 depleted layer를 제형층(umbiliform layer)이라고 명명하였다.

본 연구에서 胚乳細胞의 분해, 소실이 이루어진 제형층은 胚의 子葉 주변부에서 뚜렷하였고, 幼根 주변부에서는 미약하였다. 이것은 胚의 성장이 자엽부위쪽으로 이루어지며, 저장양분의 흡수도 이곳에서 집중적으로 이루어지고 있다는 사실을 암시하는 것이었다.

저장단백질의 분해는 蛋白質顆粒의 팽대와 융합으로 인한 중앙액포의 출현 등의 과정을 거침으로써 일어난다고 하였으나(Harris and Chrispeels, 1975; Weber and Neumann, 1980; Okamoto *et al.*, 1982; Chrispeels, 1985), 사탕수수의 澱粉性 胚乳의 蛋白質顆粒은 퇴화이전은 물론 퇴화과정 중에도 팽대되지 않았으며, 액포로 대체되지 않는다고 하였다(Pernollet, 1978). 반면에, 蛋白質顆粒은 융합되어 큰 액포를 형성하며, 저장단백질을 갖지않는 대형분자들은 산성가수분해효소에 의해 분해되어 세포성 구획을 갖는 등 蛋白質顆粒은 저장단백질의 가수분해 뿐만 아니라 세포질성 거대분자들의 자가분해에 중요한 역할을 하는 자식기관이라고 보고 하였다(Matile, 1968; Chrispeels, 1976; Van der Wilden and Herman, 1980; Herman *et al.*, 1981).

본 연구에서 종피가 열개된 후 성장중인 胚는 이미 기관형성과 함께 幼植物로서의 형태를 갖추었으며, 구상체를 갖는 蛋白質顆粒의 분해는 蛋白質顆粒의 전자밀도가 부분적으로 낮아지고, 그 내질에 과립들이 분산되어 있는 것으로 보아 구상체로부터 시작된다고 생각되며 이는 보리의 호분층을 대상으로 한 Jones(1969)의 실험 결과와 일치하는 것이었다.

또한, 胚乳細胞의 퇴행과정이 진행됨에 따라 蛋白質顆粒은 서로 융합하여 결과적으로 액포로 대체되었고, 액포는 서로 융합하여 확장되는 등, 蛋白質顆粒의 막은 융합되어 액포막을 형성한다고 보고하였던 Ashton(1976)과 Kim 등(1979)의 보고와 일치하였다.

Kim 등(1979)은 종피가 열개된 직후의 胚乳內 스페로솜은 내질에 전자밀도가 높은 작은 입자가 분포한다고 하였고, 發芽時에 蛋白質顆粒은 융합되고 확장되었으며, 스페로솜은 상대적으로 감소된다고 보고한 반면, Vigil(1970)은 發芽時에 胚乳細胞의 스페로솜은 크기가 작아져서 결국 없어진다고 하였다.

본 연구에서 스페로솜은 蛋白質顆粒과 함께 분해되어 액포로 대체되거나, 세포벽의 분해와 함께 제형층으로 이동하는 것으로 생각되었다. 또한, 이전시기에 볼수 없었던 덕티오솜은 분해된 저장물질의 세포내 이동에 관여하는 것으로 생각되었다. 아울러, 제형층과 면한 胚乳細胞壁의 분해가 활발히 진행됨을 알 수 있었다.

Breidenbach와 Beevers(1967)는 종자의 발아시 저장지방의 β -산화의 결과 생성된 acetyl CoA는 glyoxylate cycle을 거쳐 citrate가 되고 이것은 EMP回路를 거쳐 糖으로 전환되는 바, glyoxylate cycle에 관여하는 酵素는 glyoxysome(microbody)이 함유하고 있다고 하였고, Kim 등(1979)은 파종 후 人蔘種子의 胚에서 특징적으로 微小體가 관찰된다고 보고하였다.

본 연구에서 微小體는 종자의 개갑 후 胚乳細胞의 액포화가 진행되는 동안 胚乳細胞의 細胞壁과 인접하여 관찰되는 것으로 보아, 종자의 發芽時에 胚乳細胞에 나타나는 微小體는 Breidenbach와 Beevers(1967)의 견해와 같이 脂肪을 glyoxylate cycle을 거쳐 糖으로 전환시키는 역할을 하는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 胚乳는 저장물질의 胚로의 이동과 함께 퇴행과정을 밟으며, 種子의 수분흡수에 따라 야기되는 滲透壓의 증가로 인해 胚乳의 蛋白質顆粒의 막은 유지되나, 蛋白質顆粒은 팽창과 함께 加水分解가 이루어지는 것으로 생각된다. 또한, 저장단백질은 대사활동에 사용되는 것으로 보아 蛋白質顆粒은 자가분해에 있음을 암시하며, 다수의 加水分解酵素가 함유된 蛋白質顆粒의 융합에 의해 형성되는 액포는 많은 加水分解酵素를 갖고 자식활동 내지는 세포기관과 대형분자의 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

摘 要

人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 種子의 개갑 직후로부터 發芽 직전까지의 후숙과정에 있어서 저장물질의 분해와 연관된 胚乳의 미세구조 변화상을 光學 및 電子顯微鏡을 이용하여 규명하였다.

종자의 후숙단계에서는 제형층과 인접한 胚乳細胞의 蛋白質顆粒은 퇴행성 변화를 나타내었고, 이로 인해 단백질 기질은 전자밀도가 점진적으로 낮아지는 결과를 얻었으나, 이 시기에 이미 胚乳의 분해가 시작되고 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

개갑 이후의 種子에 있어서, 胚乳細胞의 퇴행과정이 더욱 진행됨에 따라 蛋白質顆粒內에는 아직 분해가 이루어지지 않은 부분이 높은 전자밀도를 지닌채 무정형의 형태로 존재하고 있었다. 분해된 蛋白質顆粒은 단백질 기질의 소실로 액포화되었으며, 이들은 점진적으로 융합과 함께 확장되

었다. 퇴행과정과 더불어 스페로솜도 점진적으로 전자밀도가 낮아지면서 분해되었다. 덕티오솜 유래의 소포들은 제형층과 접한 胚乳細胞壁과 인접하여 위치하였으며, 원형질막과 융합하였다. 胚乳細胞의 분해 잔유물로 이루어진 제형층은 다량의 섬유상 물질, 분해가 진행중인 스페로솜, 그리고 toluidine blue와 basic fuchsin에 강한 염색상을 갖는 물질 등으로 이루어져 있었다.

參 考 文 獻

- Ashton, W.M. 1976. Mobilization of storage proteins in seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**: 95-117.
- Breidnbach, R.W. and H. Beevers. 1976. Association of the glyoxylate enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 462-469.
- Brown, H.T. and G.H. Morris. 1980. Researches on the germination of some Gramineae. *J. Chem. Soc. Trans.* **57**: 458-528.
- Chrispeels, M.J. 1976. Biosynthesis, intracellular transport and secretion of extracellular macromolecules. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**: 19-38.
- Chrispeels, M.J. 1985. Immunocytochemical localization of phaseolin and phytohemagglutinin in the ER and Golgi complex of developing bean cotyledons. *Planta* **164**: 295-302.
- Dwart, D. and A.E. Ashford. 1982. The chemistry and microstructure of protein bodies in celery endosperm. *Bot. Gaz.* **143**: 164-175.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plant*, John Wiley & Sons, New York, 550 p.
- Harris, N. and M.J. Chrispeels. 1975. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein autolysis in cotyledons of germinating mung bean. *Plant Physiol.* **56**: 292-299.
- Jacobsen, J.V., T.J.V. Higgins and J.A. Awar. 1979. Hormonal control of endosperm function during germination. In: *The Plant Seed: development, preservation and germination*, I. Rubenstein, R.L. Phillips, C.E. Green and B.G. Gengenbach (eds.). Academic Press, London. pp. 241-262.
- Jones, R.L. 1969. The fine structure of barley aleurone cells. *Planta* **85**: 359-375.
- Kim, W.K. 1984. Ultrastructural and histochemical studies of the ginseng seed. Matured endosperm cells. *Korean J. Electron Microscopy* **14**: 15-28.
- Kim, W.K. 1989. An immunocytochemical study on storage proteins of ginseng seed. *Korean J. Electron Microscopy* **19**: 74-84.
- Kim, W.K., Park, E.S. Kim and S.S. Han. 1979. Ultrastructural changes during germination of ginseng seeds (*Panax ginseng*). *Korean J. Electron Microscopy* **9**: 57-64.
- Matile, P. 1968. Lysosomes of root tip cells in corn seedling. *Planta* **79**: 181-186.
- Okamoto, K., T. Murai, G. Eguchi, M. Okamoto and T. Kazawa. 1982. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. II. Ultrastructural changes in scutellar epithelium. *Plant Physiol.* **70**: 905-911.
- Pernollet, J.C. 1978. Protein bodies of seeds. ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry* **17**: 1473-1480.
- Van der Wilden, W. and E.M. Herman. 1980. Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**: 428-432.
- Vigil, E.L. 1970. Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* **46**: 435-454.
- Weber, E. and D. Neumann. 1980. Protein bodies, storage organelles in plant seeds. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **175**: 279-306.
- Yu, S.C., B.K. Jeong and W.K. Kim. 1988. Studies on the developmental processes of the protein body in the ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) endosperm cell. *Korean J. Electron Microscopy* **18**: 141-152.
- Yu, S.C. and W.K. Kim. 1991. Ultrastructural changes and formation of storage materials on endosperm cells during the seed formation of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Bot.* **34**: 201-213.
- Yu, S.C., E.J. Chae and W.K. Kim. 1991. Endoplasmic reticulum and protein body formation in developing endosperm cells of ginseng seed. *Korean J. Ginseng Sci.* **15**: 131-138.

(1992. 2. 14 接受)

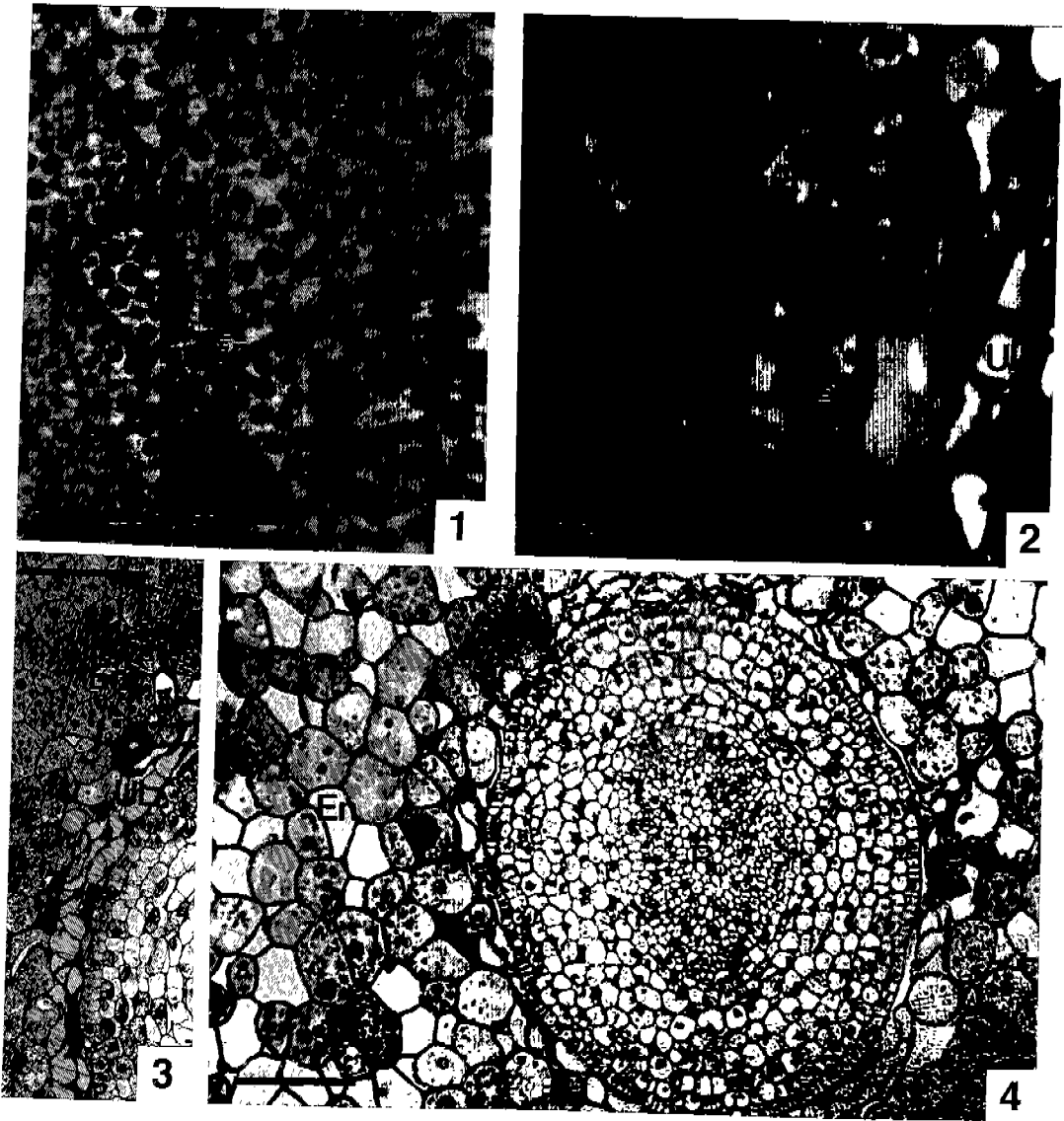


Plate I. Light micrographs of dehiscent seed. Bar=200 μ m.

1. Protein bodies (PB) of dehiscent seed are undegradated in the outer layers of endosperm cells (En), but are degraded in the inner layers. 2. Protein bodies (PB) of endosperm cells contacting of umbiliform layer (UL) at the embryonic region showed postive reaction of basic fuchsin compairing the embryo and endosperm. 4. Umbiliform layer contacted with radicle (R) showed development and low stainability with methylene blue and basic fuchsin.

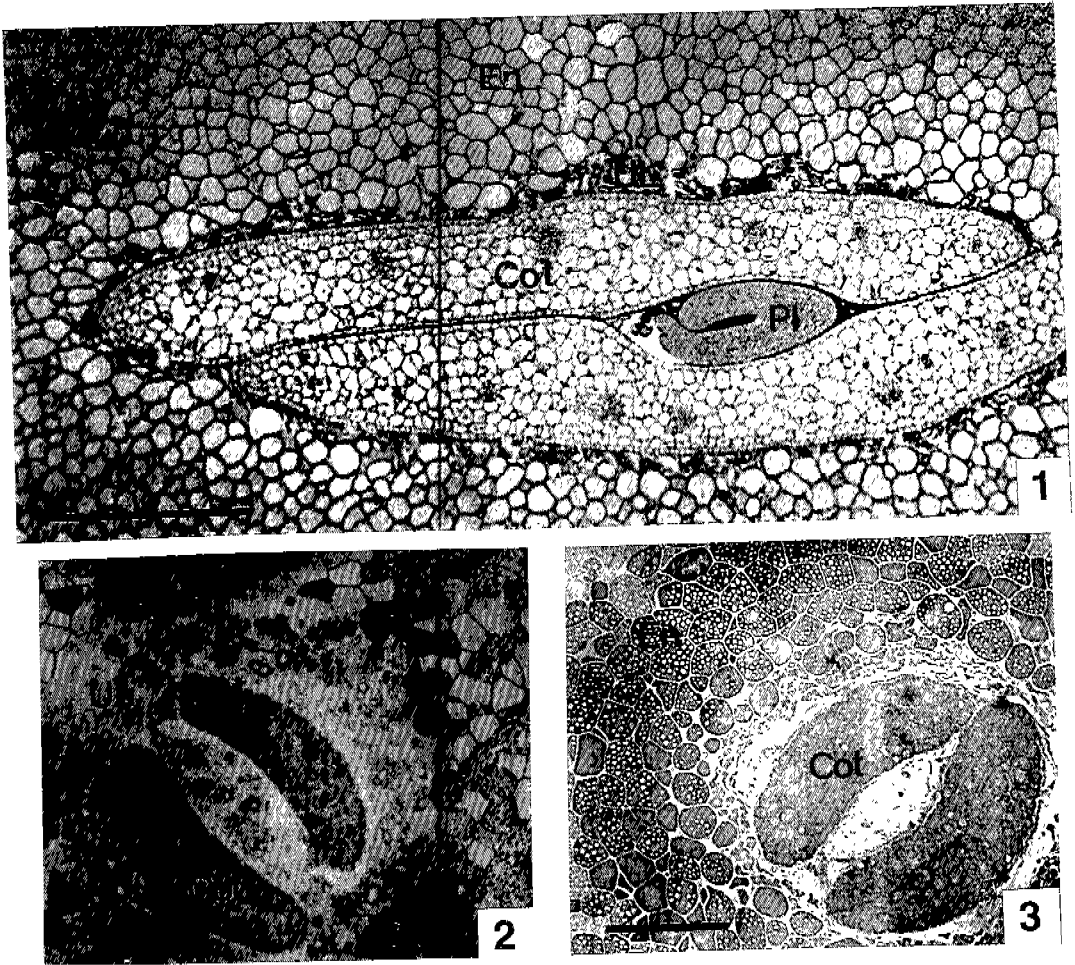
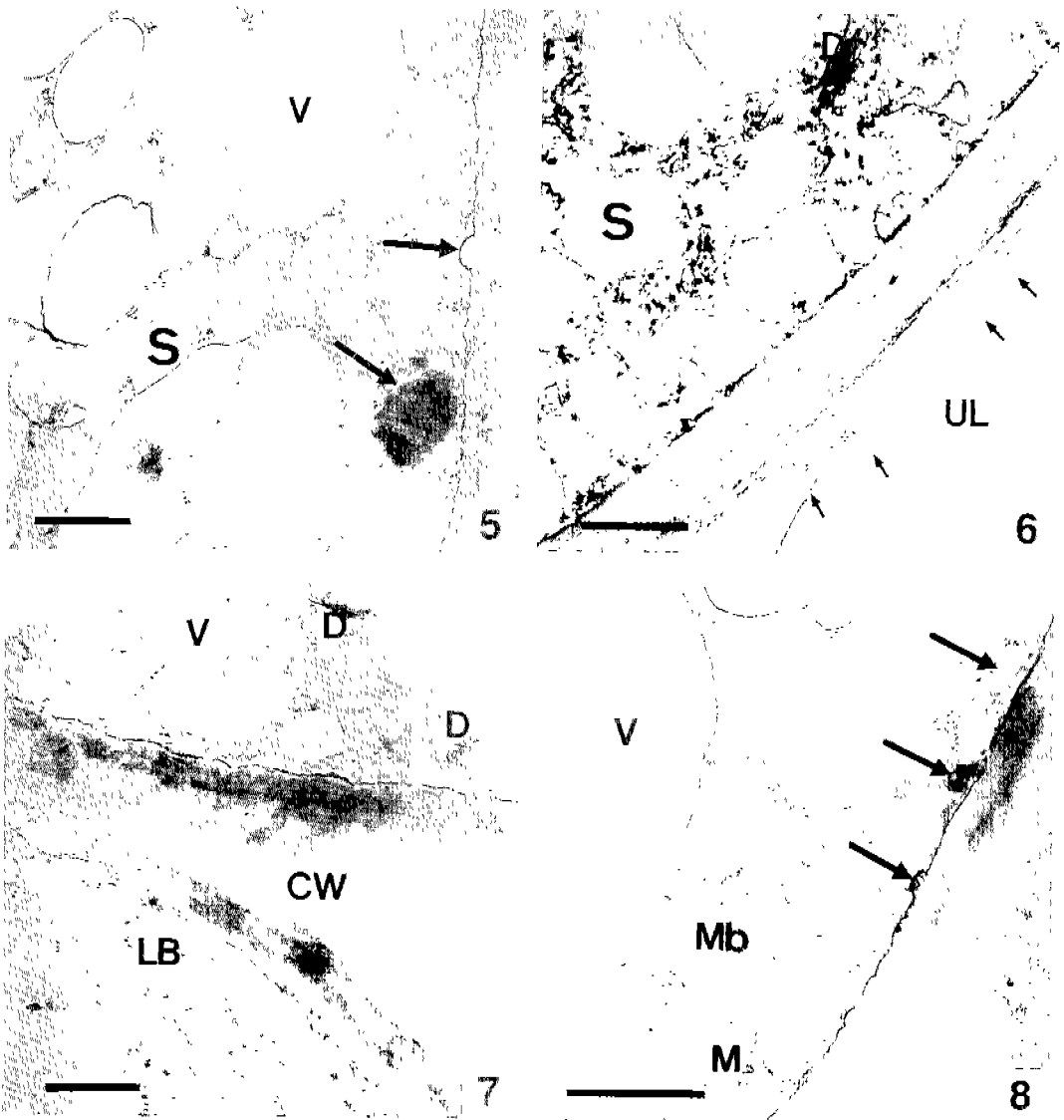


Plate II. Light micrographs of dehiscent seed before germination. Bar=200 μ m.

1-4. Completely differentiated embryo with 4.0~4.5 mm in length at the stage just before germination consisted of cotyledon (Cot) and plumule (Pl). Note the inclusions of umbiliform layer (UL) derived from lysed not only protein bodies but also cell wall of endosperm cell components.



5. Electron dense amorphous granules (arrows) move into the plasma membrane near the umbiliform layer (UL). 6, 7. Endosperm cell wall (CW) contacting with umbiliform layer (UL) are degraded and then it consisted of deformed cell wall and cellulose microfibril (arrows). The result was that cell wall became thinned. Dictyosomes (D) near the cell wall are observed in endosperm contacting with umbiliform layer. Numerous vesicles are fused with plasma membrane. 8. Protein bodies are fused and then replaced by vacuoles (V). Vacuoles are fused together and then expanded. Microbody (Mb) and mitochondria (M) near cell wall are observed. Electron dense vesicles (arrows) are fused with plasma membrane in vacuolated endosperm cell.

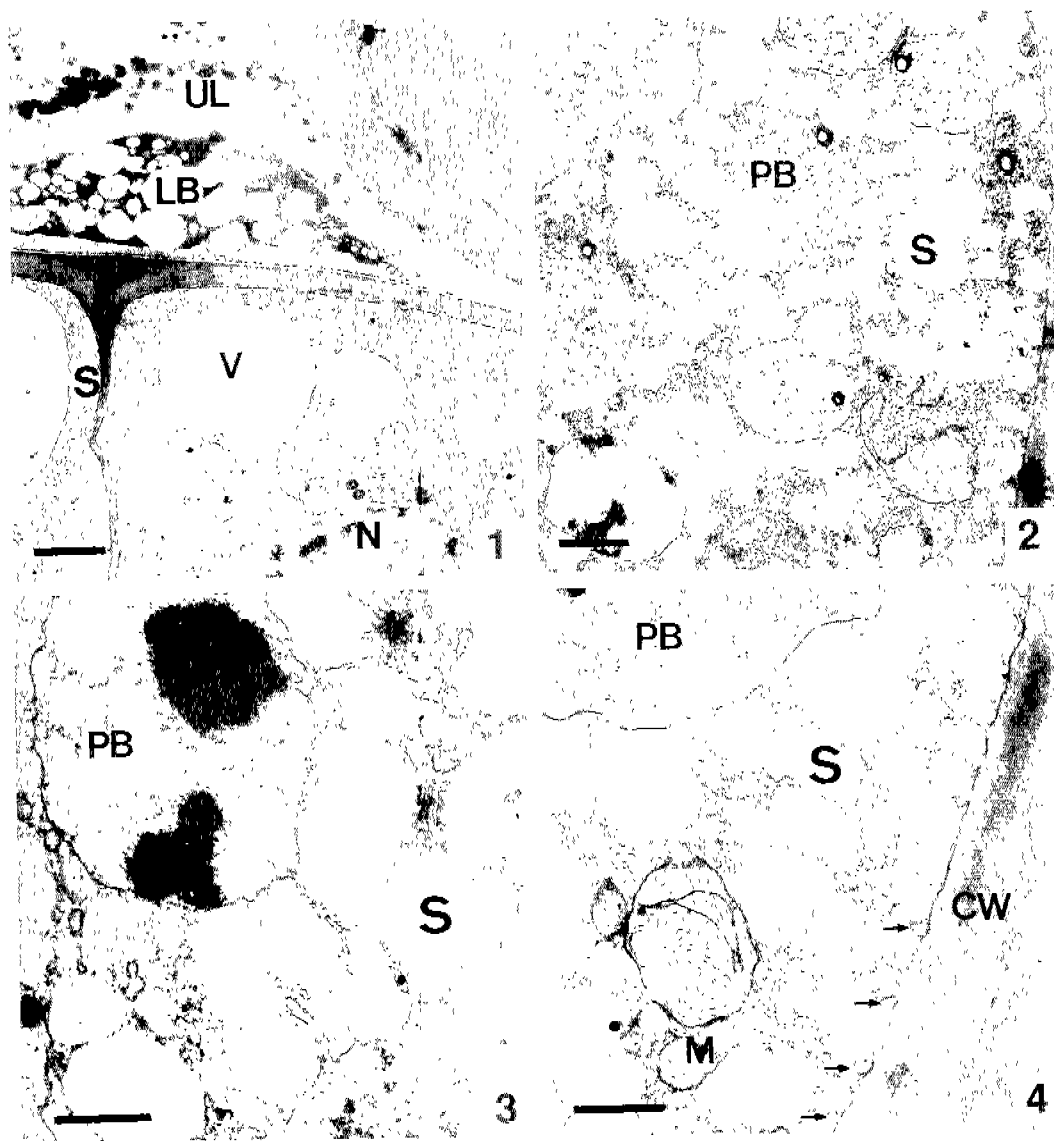


Plate III. Electron micrographs of the endosperm, umbiliform layer and embryo of dehiscent seed before germination. Bar=1.0 μ m.

1. Developing embryo contains the nucleus (N), vacuole (V), mitochondria and endoplasmic reticulum. Spherosomes (S) near the cell wall are observed. Lipid body (LB) and electron-dense inclusions appear in umbiliform layer (UL).
 2. degenerated protein bodies (PB) contain the limiting membrane and irregular shaped spherosomes are decreased.
 3,4. Electron dense proteinaceous materials are fused together and are decreased in volume. Spherosomes are decreased and divide their inner portion into membranous structure and then lysis begin at the peripheral regions of membrane of them. Mitochondria (M) and membranous structure appear. Vesicles (arrows) are fused with plasma membrane. CW; cell wall; PB; protein body.