

人蔘 켈러스로부터 分離 및 培養된 原形質體의 電子顯微鏡的 研究

朴 鍾 範*

釜山女子大學校 自然科學大學 生物學科

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 뇌두 켈러스로부터 분리한 원형질체와 배양된 원형질체의 미세구조 변화와 원형질막 표면을 투과 및 주사전자현미경으로 조사하였다. 분리 직후의 원형질체에서는 켈러스세포에서보다 작은 액포들이 많이 형성되어 있었다. 또한 활면소포체의 수가 증가하였으며 이들은 원형질막과 평행으로 배열하였다. 활면소포체는 가끔 세포질을 둘러싸서 세포질분리체(cytosegrcsome)를 형성하였고, 이 구조는 세포질을 분해시킨 후 액포로 변화하기도 하였다. 배양된 원형질체에서는 분리 직후의 원형질체와 비교하여 조면소포체, 디티오솜, 리보솜, 미토콘드리아, proplastid 및 액포 등의 수가 현저하게 증가하였다. 디티오솜으로부터 많은 소낭들이 형성되었고 이들은 세포질 전반에 걸쳐 존재하였다. 때로는 소낭들이 원형질막 바깥으로 돌출되어 돌기를 형성하기도 하였다. 배양된 원형질체의 표면에는 섬유소로 구성되어 있을 것으로 추정되는 섬유상 구조들이 형성되어 있었다.

주요어: 인삼, 원형질체, 미세구조 변화, 세포질분리체, 섬유상 구조

Cocking(1966)이 담배 엽육세포에서 분리한 원형질체에서 TMV의 감염에 따라서 일어나는 미세구조의 변화를 처음으로 관찰, 연구한 이후 여러 식물의 원형질체에서 배양상태에 따라 일어나는 미세구조의 변화상을 관찰한 보고가 많이 있다(Cocking and Pojnar, 1969; Cocking, 1970; Power and Cocking, 1970; Benbadis, 1971; Withers and Cocking, 1972). *Ammi visnaga*의 켈러스 세포와 여기에서 분리한 원형질체의 미세구조를 비교한 결과, 원형질체는 켈러스 세포에서보다 소포체와 리보솜 등의 세포기관들이 많았으며 이러한 변화는 세포벽 형성과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다(Fowke *et al.*, 1973). 또한 담배 엽육세포 원형질체를 배양하여 전자현미경으로 관찰한 결과 원형질체 속의 소포체가 원형질막에 밀접하게 위치하고 있었으며 디티오솜의 수가 증가하였고, 여기에서 유래된 소낭의 수도 대단히 증가하였음이 보고된 바 있다(Prat, 1972; Roland, 1973). 또한 소낭 속에 세포벽 형성 물질이 들어있는 것이 관찰되어 이들이 세포벽 형성 물질을 합성한다는 보고도 있다(Burgess and Fleming, 1974). 콩(*Glycine max*)의 현탁배양세포에서 분리한 원형질체를 배양하였을 때 디티오솜에서 유래된 coated vesicle이 많이 형성되어 있음이 관찰되어 디티오솜이 세포벽 형성에 중요한 역할을 하고 있음을 강력히 시사하였다(Tanchak *et al.*, 1984). 한편 운향과의 1종인 *Skimmia japonica*의 엽육세포와 켈러스세포에서 각각 분리한 원형질체를

배양하였을 때, 배양된 원형질체에서 소포체의 양이 엽육세포나 켈러스세포에서보다 훨씬 증가되었다. 따라서 소포체로부터 섬유소(cellulose) 전구체 물질이 생산된다고 보고하여 소포체가 세포벽 형성과 밀접한 관련이 있음을 시사하였다(Robenek and Peveling, 1977).

주사전자현미경 관찰에 의한 원형질체 연구는 담배 엽육세포에서 분리한 직후의 원형질체와 24시간 배양한 원형질체에서 원형질막 표면에 생긴 변화를 처음으로 비교, 관찰하였다. 그 결과, 분리 직후의 원형질체 표면에는 아무런 구조가 생기지 않았으나 24시간 배양한 후의 원형질체 표면에는 여러가지 형태의 변화를 관찰할 수 있었다(Burgess *et al.*, 1973). 그 이후 배양에 따른 원형질체 표면에서의 변화에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Kiermayer and Dobberstein, 1973; Robenek and Peveling, 1977; Burgess and Linstead, 1979; Van der Valk *et al.*, 1980; Van der Valk and Fowke, 1981; Fowke *et al.*, 1983). Herth와 Meyer(1977), Burgess 등(1977, 1978)은 배양한 담배 엽육세포 원형질체의 원형질막 표면에서 섬유(fibril)와 비슷한 구조를 관찰하였는데 이 구조는 섬유소 성분으로 구성되어 있었고, 이는 원형질막 표면에서 중합과정을 거쳐 섬유와 비슷한 구조로 형성된다고 주장하였다. 이와 같이 배양된 원형질체 표면에 섬유소 성분의 섬유가 존재함은 여러 연구자들에 의해서 관찰된 바 있다(Burgess and Fleming, 1974; Williamson *et al.*, 1977; Burgess *et al.*, 1978).

이상과 같이 고등 식물의 여러 조직에서 분리된 원형질체와

*교신저자: Fax (051) 305-5206

배양된 원형질체의 변화를 전자현미경으로 관찰하여 원형질체내의 세포기관들이 세포벽 형성과 어떠한 관련성을 갖고 있는지를 알기 위하여 많은 연구가 수행되고 있다. 그러나 세포기관이 세포벽 형성과정에서 어떠한 역할을 하고 있는지에 대하여는 정확하게 밝혀져 있지 않은 상태이다. 따라서 본 연구는 인삼 뇌두조직을 배양한 캘러스로부터 i) 원형질체를 분리하였을 때 효소에 의한 세포벽 제거가 원형질체의 미세구조에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하고, 또한 ii) 분리된 원형질체와 배양된 원형질체의 미세구조 변화와 원형질막 표면의 변화를 전자현미경으로 관찰하여 세포기관들과 세포벽 형성과의 연관성을 조사할 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

실험재료

4-5년생 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 뇌두조직편을 캘러스배양의 재료로 사용하였고, 배양 결과 얻어진 캘러스덩어리를 4-5주 간격으로 계대배양하여 형성된 연한 캘러스조직을 원형질체 분리와 배양의 실험재료로 사용하였다.

캘러스 배양

4-5년생 인삼의 뇌두를 절취하여 2%(v/v) sodium hypochlorite 용액으로 약 15분간 표면살균하고, 멸균수로 3-4회 세척한 후 두께 2 mm 크기로 절단하여서 캘러스유도 배지에 삽식하여 growth cabinet(Yanaco)속에서 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 암배양하였다. 캘러스유도 배지는 MS기본배지(Murashige and Skoog, 1962)에 2,4-D 5 mg/L와 kinetin 1 mg/L 및 agar(Difco) 10 g/L를 첨가하여 고압멸균시켰다. 배양된 캘러스 조직은 4-5주 간격으로 계속 새로운 MS배지에 계대배양하여 캘러스를 유지하였다.

원형질체의 분리 및 배양

50 mL Erlenmeyer flask에 효소용액(Table 1) 10 mL을 넣고

그 속에 계대배양하여 얻어진 연한 캘러스조직 1 g을 넣어서 약 $27-28^\circ\text{C}$ 에서 3-5시간 진탕(45-50 rpm)시켰다. 진탕 후 얻어진 세포현탁액을 직경 100 μm pore mesh로 여과시킨 다음 원심분리(100 g, 5분)하였다. 상정액인 효소용액을 제거시킨 후, 나머지 원형질체 침전물은 0.5 M sucrose 용액 5 mL로 현탁시키고 그 상층에 0.5 M mannitol 용액 1 mL을 첨가한 다음 원심분리(100 g, 5분)하여 살아있는 원형질체만을 순수분리하였다. 순수분리된 원형질체는 Pasteur pipette를 사용하여 모은 후 MS배지에 2,4-D 1 mg/L, NAA 4 mg/L, BAP 1 mg/L, 1% DMSO 및 0.4 M mannitol이 첨가된 원형질체 배양배지액으로 3회 원심분리하여 세척하였다. 원형질체 배양방법은 liquid-on-agar 배양법(Barakat and Cocking, 1985)으로 직경 50 mm plastic petri dish에 0.8% agar를 첨가시킨 원형질체 배양배지를 2.5 mL 정도 얇게 깔아 굳힌 다음, 원형질체의 밀도가 $5 \times 10^4-10^5/\text{mL}$ 되도록 배양액으로 조절된 원형질체 현탁액을 0.5-1.0 mL 정도 넣고 parafilm으로 밀봉하여 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 암배양하였다.

투과전자현미경 관찰

원형질체를 원심분리하여 모은 다음 0.4 M mannitol이 첨가된 2.5% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 3시간 전고정한 후 0.05 M cacodylate buffer(pH 6.8) 용액으로 30분간 5회 세척하였다. 세척된 재료는 상기 buffer로 완충된 1% osmium tetroxide 용액으로 실온에서 3시간 후고정시켰다. 후고정이 완료된 재료는 증류수로 15분간 3회 세척하고 난 후 ethanol 상승농도순으로 탈수시켜서 propylene oxide로 치환한 다음 Araldite-Epoxy resin에 매몰시켜 block을 만들었다. 절편은 유리칼을 사용하여 Sorvall Porter-Blum MT-2 ultramicrotome으로 만들었다. 두꺼운 절편은 0.05% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였으며, 금은색 절편은 포화 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 다음 투과전자현미경(JEM 120 CXII/ASID)으로 80 kV에서 관찰, 촬영하였다.

주사전자현미경 관찰

원심분리하여 모은 원형질체를 0.4 M mannitol이 첨가된 3% glutaraldehyde 용액으로 실온에서 3시간 전고정한 후 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 용액으로 20분간 3회 세척하였다. 그리고 상기 buffer로 완충된 1% osmium tetroxide 용액으로 후고정시킨 후 ethanol 상승농도순으로 탈수하였다. 탈수가 끝난 재료는 여과지(Whatman No. 1)에 올려 N-amyliacetate로 치환시켜 CO_2 를 이용한 임계점 건조기(Ladd 28000)

Table 1. Composition of the enzyme solution for the protoplast isolation

Constituents	Concentration
D-Mannitol	0.5 M
Macerozyme R-10	0.5%
Cellulase "Onozuka" R-10	1.5%
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.6 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.8 mM
2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)	0.2 mM
pH	5.7-5.8

로 건조시켰고, 동판위에 양면 Scotch tape를 붙이고 그 위에 재료가 붙어 있는 여과지를 부착시켰다. 부착된 여과지측면에 silver paint로 mounting하였다. 동판에 부착된 재료는 ion sputter(JEOL JFC 1100)에 넣고 gold-paladium으로 이온증착시켜 주사전자현미경(JEOL EM-ASID-4D)으로 40 kV에서 관찰, 촬영하였다.

결 과

캘러스세포의 전자현미경적 특징

캘러스세포는 세포벽이 뚜렷이 보이고, 중앙에 액포가 크게 발달되어 있어 세포질이 주변부위에 얇은 층으로 존재하고 있었다(Fig. 1). 1개 세포에 1개의 핵이 존재하며 세포기관들이 핵 주변의 세포질 속에 밀집되어 있었는데, 색소체는 미분화 상태였고 소포체는 거의 관찰되지 않았으며, 미토콘드리아는 구형 또는 난형으로 핵 주위에 분포하였다(Fig. 2). 또한 두 세포 사이에는 중엽구조가 잘 보이고 가끔 원형질연락사를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

분리된 원형질체의 전자현미경적 특징

효소처리하여 즉시 분리된 원형질체는 세포벽이 완전히 분해되어 소실되었으며, 그 결과 원형질막에 의해서만 둘러 싸여있고 거의 구형에 가까웠으며, 세포질 속에 다수의 작은 액포들이 있었다(Figs. 4a, b). 분리 직후의 원형질체는 캘러스세포에 비하여 세포기관들의 수가 많이 증가하였으며 핵 근처에 위치하고 있었다. 특히 소포체의 수가 현저하게 증가하였는데 대체로 곧은 모양의 활면소포체가 세포질 전체에 분포하고 있으며, 특히 세포 가장자리에서는 원형질막과 거의 평행으로 배열되어 있었다(Fig. 5). 또 활면소포체가 세포질 및 세포기관들을 둘러싸고 있는 세포질분리체(cytosegresome)의 구조도 관찰되었다(Fig. 6). 이 구조는 분리되었던 세포질에서부터 대체적으로 원심적으로 자가분해되어서(Figs. 7, 8) 나중에 최외부의 단일막으로 경계된 액포의 형태로 변화됨을 관찰할 수 있었다(Figs. 9, 10, 11). 이때 세포질 잔유물질이 액포 속에 남아있는 경우도 보였다(Figs. 10, 11). 주사전자현미경 관찰에 의하면 분리된 직후의 원형질체는 전형적인 구형을 하고 있었으며, 원형질막 표면은 세포벽 물질이 완전히 소실되어 잔유물질이 없이 매끄럽고 부드러운 면을 가지고 있었다(Figs. 12, 13).

배양된 원형질체의 전자현미경적 특징

배양된 원형질체는 세포의 크기가 매우 커지고 길이가 신

장되어 난형을 이루고 있었으며, 배양시간이 경과할수록 점차 타원형으로 변하였다(Fig. 14a). 또 분리된 직후의 원형질체보다 세포기관들이 상당히 증가하였는데, 특히 소포체, 디티오솜, 미토콘드리아, 리보솜, 액포 등이 현저하게 증가하였다(Figs. 14b, 15, 16). 소포체는 대부분 조면소포체로서 세포질 전체에 분포하였고 원형질막과 평행으로 길게 배열되어 있었다(Fig. 15). 이러한 조면소포체는 배양시간이 5일 정도 경과된 원형질체에서도 관찰되었다. 디티오솜은 곧고 짧은 cisternae로 구성되어 있었고 그 주위에 많은 소낭들이 형성되어 있었으며, 이들은 소포체와 밀접하게 위치하였다(Fig. 16). 또 원형질막 주위에 소낭들이 많이 밀집되어 있었고(Fig. 17), 가끔 소낭이 원형질막 바깥으로 돌출되어 있는 경우도 있었다(Fig. 18). 디티오솜은 배양기간이 경과할수록 cisternae가 길어졌으며 이로부터 형성된 소낭들은 세포질 속에 많이 산재되어 있었다(Fig. 19). 미토콘드리아는 보통 구형이나 난형의 활성화된 형태로 세포질 전체에 분포하였고(Fig. 20), 가끔 매우 길게 신장된 것도 관찰되었다(Fig. 21). 배양된 원형질체를 주사전자현미경으로 관찰하면 12시간 후에는 원형질막 표면에 이중막 구조의 조그마한 소낭들이 융기되어 있는 모습이 관찰되었는데(Fig. 22), 배양 1일 후에는 가느다랗고 짧으며 끝이 좁은 섬유상 구조가 원형질막 표면에 형성되어 있었다(Fig. 23).

고 찰

인삼 캘러스조직을 효소처리하여 분리한 원형질체에서 세포질의 일부가 활면소포체에 둘러싸여 분리된 구조(세포질분리체, cytosegosome)가 관찰되었으며, 세포질 속에 작은 액포들이 발달되어 있었다. 이 액포는 세포질분리체에서 유래된 것으로 보이는데, 세포질분리체 속의 세포질이 점차 자가분해되어 단일막인 tonoplast로 경계된 액포가 형성되는 과정이 관찰되고 있다. 세포질분리체는 Ericsson(1969)이 처음으로 관찰, 보고하였는데 cytolysome(Brandes and Bertini, 1964) 또는 autophagic vacuole(Kupila-Ahvenniemi *et al.*, 1978; Marty, 1978; Sekhar and Sawheney, 1985) 등으로 불리워지기도 한다. 이 구조는 세포의 생리가 대사적으로 또는 병리적으로 변화가 일어나는 조직에서 흔히 관찰된다고 알려져 있다(Brandes and Bertini, 1964). 대사활성이 급격히 높아진 식물세포에서 세포질의 일부가 1-2개의 활면소포체에 의해 포위되어서 세포질분리체의 구조를 형성한 후, 분리된 세포질이 분해되므로 이는 동물세포에서 관찰되는 secondary lysosome과 유사한 구조를 나타내고 있다고 보고되었다(Kupila-Ahvenniemi *et al.*, 1978; Sekhar and Sawheney, 1985). Marty(1978)는 대극과의 1종인 *Euphorbia characias*의 근단 분열조직 세포에서 autophagic vacuole에 의해서 세포질이 분해되어 액포가 형성됨을 관찰한

바 있는데, 이러한 액포는 세포질이 autophagy 되어 형성되므로 autophagosome이라고 보고하였다. 이러한 액포가 많이 나타나는 현상은 cellulase, macerozyme 및 mannitol 등의 처리에 따른 급격한 삼투압의 변화에 의해서 일어나는 삼투 충격 때문인 것으로 해석된다(Gigot *et al.*, 1975).

Robenek와 Peveling(1977)은 운향과의 1종인 *Skimmia japonica*의 캘러스 세포에서 분리한 원형질체를 배양하였을 때, 배양된 원형질체에서 세포벽 재생이 일어나는 동안 소포체의 수가 증가하였고 이들은 원형질막과 매우 밀접하게 평행배열되어 있음을 관찰하였는데, 그들은 소포체가 세포벽 물질의 합성부위라고 하였다. 또한 소포체가 섬유소 전구체 혹은 섬유소 전구체 합성효소를 생산하기 때문에 이러한 소포체가 세포벽 형성의 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Burgess and Fleming, 1974; Robenek and Peveling, 1977). 그러나 본 실험에서는 분리 직후의 원형질체와 비교하여 배양된 원형질체에서 소포체의 수적 증가가 뚜렷하게 관찰되지 않았기 때문에 소포체가 세포벽 형성에 관여하는지는 정확히 알 수 없었다. 반면, 원형질체 분리 직후에는 활면소포체가 많이 형성되었으나 배양된 원형질체에서는 조면소포체가 많이 관찰되어 배양기간 동안 많은 리보솜들이 생성되었음을 알 수 있었다.

배양 초기의 원형질체 세포질 속에는 많은 디티오솜이 존재하고 있는데, 이들 디티오솜은 곧고 짧은 cisternae로 구성되어 있고 그 주위에 많은 소낭들이 형성되어 있었다. Gaham와 McLean(1969)은 콩과식물의 1종인 *Vicia faba*의 뿌리 정단 세포에서 세포벽 형성과정을 연구한 결과, 디티오솜이 소낭을 형성하고 이들이 세포 밖으로 방출되어 새로운 세포벽이 형성된다고 하였다. Ray 등(1969)은 완두콩 줄기의 원형질체에서 다당류 생합성에 관여하는 효소(glucan synthetase I; Quail, 1979)가 디티오솜에서 합성된다고 하였다. 그들은 이 효소를 갖고 있는 소낭들이 디티오솜에서 떨어져 나와 원형질막쪽으로 이동하여 소낭내의 효소들이 방출되어 원형질막 표면에 세포벽이 형성된다고 하였다. 또한 Kiermayer와 Dobberstein(1973)는 디티오솜이 섬유소 합성효소를 합성하고 이 효소는 소낭을 통해 원형질막으로 이동하여 거기에서 합성효소가 활성화되어 세포벽이 형성된다고 하였다. 이상의 연구보고들은 디티오솜과 소낭들이 세포벽 형성과 매우 밀접한 연관성이 있음을 시사하고 있다. 인삼 캘러스로부터 분리한 원형질체를 배양하였을 때에도 배양 초기의 원형질체에서 많은 디티오솜과 소낭들이 존재하고 있음이 밝혀져 이러한 사실을 지지하여주고 있다.

원형질체의 배양시간이 경과할수록 구형이 점차 신장되어 난형으로 변하였고, 특히 소포체, 디티오솜, 미토콘드리아, 리

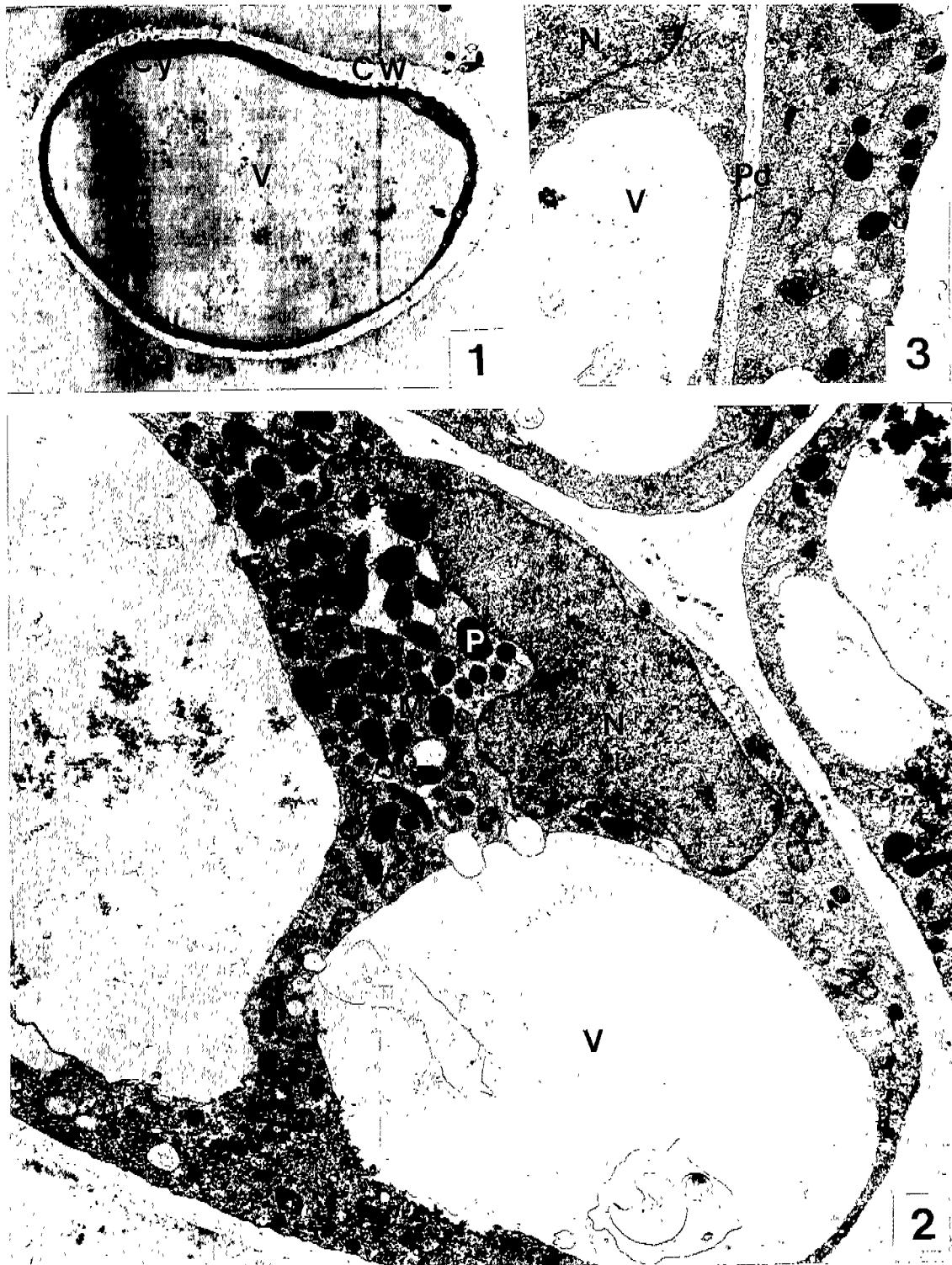
보솜, proplastid, microtubule 등의 수가 매우 증가하였다. 세포기관의 증가현상은 세포가 매우 활성화되었음을 나타내며, 이러한 활성화는 앞으로 이루어질 원형질체의 세포벽 형성 및 세포분열을 준비하기 위한 것으로 보인다(Fowke *et al.*, 1973; Robenek and Peveling, 1977). Matile(1968, 1978)은 발아된 옥수수의 근단세포에서 액포는 식세포작용(phagocytosis)에 의하여 여러가지 세포내 구성구조(리보솜, 미토콘드리아, 여러 막조각들)를 포함하고 있다고 하였다. 그는 이러한 액포들은 서로 융합을 하여 큰 액포가 되고 이 현상이 계속됨으로써 액포 속에 포함된 물질을 일정한 방향으로 수송한다고 하였다. 12시간 배양된 원형질체에서 표면에 형성되어 있는 돌기는 소낭내의 세포벽 물질이 원형질막 바깥으로 방출되어 가늘고 긴 미소섬유구조가 형성된 것으로 관찰되었다. 배양시간이 경과할수록 섬유상구조가 계속 형성되어 이웃한 섬유와 서로 연결되어 있었다. 이는 섬유상구조가 식물세포의 원형질막 표면에서 형성되는 경우나(Chrispeels, 1976; Robinson, 1977), 새로 형성된 세포벽은 느슨하게 배열된 미소섬유구조들이 그 물모양으로 나타난다는 경우(Prat and Roland, 1971; Robinson and Preston, 1972) 등과 본 실험 결과가 거의 일치함을 보여주고 있다.

인 용 문 헌

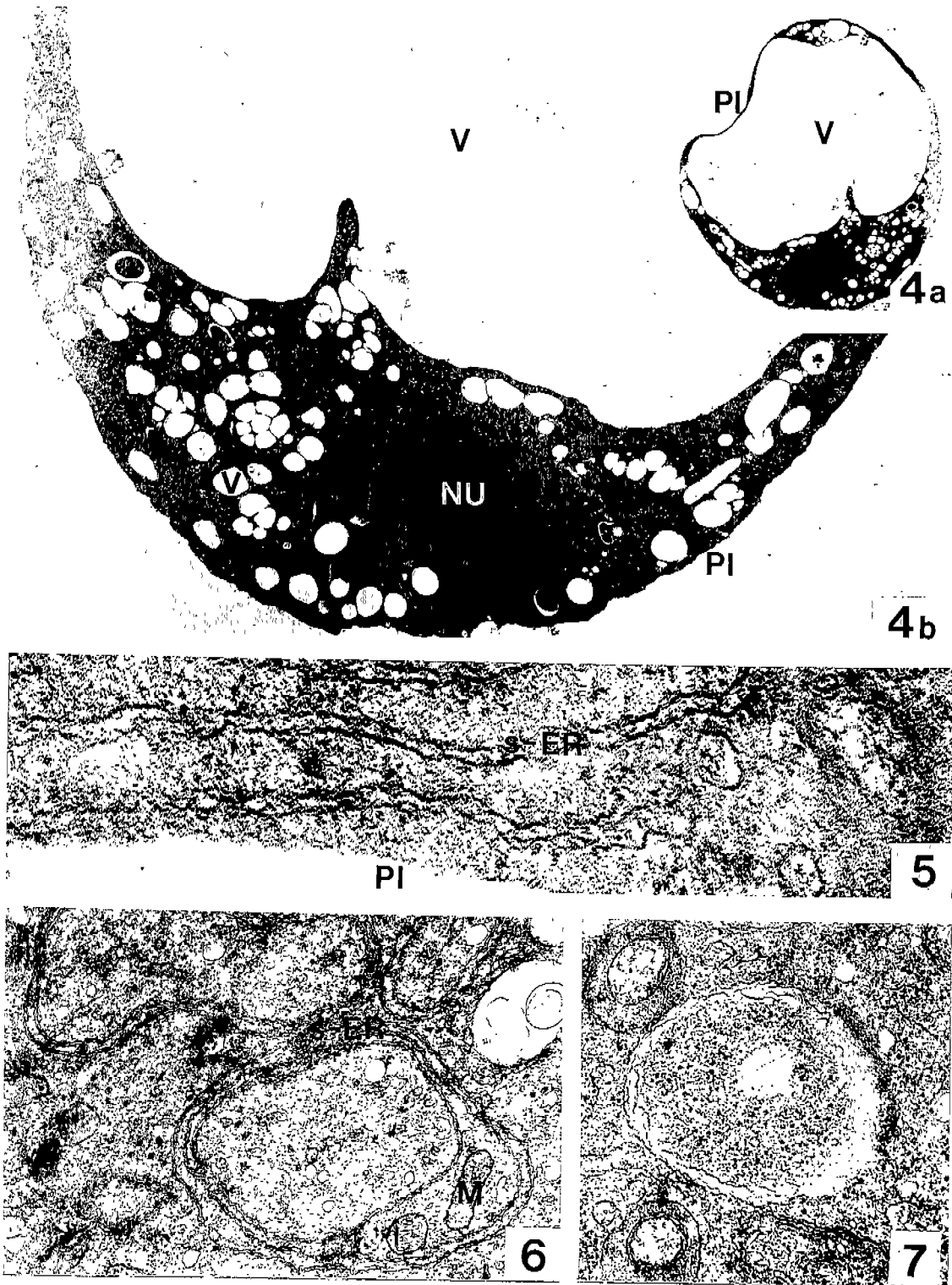
- Barakat, M.N. and E.C. Cocking. 1985. An assessment of the cultural capabilities of protoplasts of some wild species of *Linum*. *Plant Cell Report* 4: 164-167.
- Benbadis, A. 1971. Aspects ultrastructuraux et culture *in vitro* de protoplastes de mesophyll de tabac (*Nicotiana tabacum*). *C. R. Acad. Sci. Paris* 273: 797-800.
- Brandes, D. and F. Bertini. 1964. Role of Golgi apparatus in the formation of cytolysosomes. *Exp. Cell Res.* 35: 194-217.
- Burgess, J. and E.N. Fleming. 1974. Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts. *J. Cell Sci.* 14: 439-449.
- Burgess, J. and P.J. Linstead. 1979. Structure and association of wall fibrils produced by regenerating tobacco protoplasts. *Planta* 146: 203-210.
- Burgess, J., P.J. Linstead and V.E. Bonsall. 1978. Observation on the time course of wall development at the surface of isolated protoplasts. *Planta* 139: 85-91.
- Burgess, J. P.J. Linstead and V.E.L. Fisher. 1977. Studies of higher plant protoplasts by scanning electron microscope. *Micron*. 8: 113-122.
- Burgess, J., J.W. Watts, E.N. Fleming and J.M. King. 1973. Plasmalemma fine structure in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 110: 291-301.
- Chrispeels, M.J. 1976. Biosynthesis, intracellular transport and secretion of extracellular macromolecules. *Annu.*

- Rev. Plant Physiol.* **27**: 49-58.
- Cocking, E.C.** 1966. An electron microscopic study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. *Planta* **68**: 206-214.
- Cocking, E.C.** 1970. Virus uptake, cell wall regeneration, and virus multiplication in isolated plant protoplasts. *Int. Rev. Cytol.* **28**: 89-124.
- Cocking, E.C. and E. Pojnar.** 1969. An electron microscopic of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. *J. Ger. Virol.* **4**: 305-312.
- Ericsson, J.L.E.** 1969. Studies on induced cellular autophagy. I. Electron microscopy of cells with *in vitro* labelled lysosomes. *Exp. Cell Res.* **55**: 95-106.
- Fowke, L.C., C.W. Bech-Hansen, O.L. Gamborg and J.P. Shylu.** 1973. Electron microscopic observations of cultured cells and protoplasts of *Ammi visnaga*. *Am. J. Bot.* **60**: 304-312.
- Fowke, L.C., P.J. Rennie and F. Constabel.** 1983. Organelles associated with the plasma membrane of tobacco leaf protoplasts. *Plant Cell Report* **2**: 292-295.
- Gaham, P.G. and J. McLean.** 1969. Subcellular localization and possible functions of acid β -glycerophosphatases and naphthol esterases in plant cells. *Planta* **89**: 126-135.
- Gigot, C., M. Kopp, C. Schmitt and R.G. Milne.** 1975. Subcellular changes during isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts. *Protoplasma* **84**: 31-41.
- Herth, W. and Y. Meyer.** 1977. Ultrastructural and chemical analysis of the wall fibrils synthesized by tobacco mesophyll protoplasts. *Biol. Cellulaire* **30**: 33-40.
- Kiermayer, O. and B. Dobberstein.** 1973. Membrankomplexe dictyosomaler Herkunft als "Matrizen" für die extraplastische Synthese und Orientierung von Mikrofilamenten. *Protoplasma* **77**: 437-451.
- Kupila-Ahvenniemi, S., S. Pihakaski and K. Pihakaski.** 1978. Wintertime changes in the ultrastructure and metabolism of the microsporangiate strobili of the scotch pine. *Planta* **144**: 19-29.
- Marty, F.** 1978. Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**: 852-856.
- Matile, Ph.** 1968. Lysosomes of root tip cells in corn seedlings. *Planta* **79**: 181-186.
- Matile, Ph.** 1978. Biochemistry and function of vacuoles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 193-203.
- Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Power, J.B. and E.C. Cocking.** 1970. Isolation of leaf protoplasts: Macromolecule uptake and growth substance response. *J. Exp. Bot.* **21**: 64-70.
- Prat, R.** 1972. Ultrastructural study of the first stages in the formation of a new wall by plant protoplasts mechanically separated from their original wall. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D.* **274**: 1477.
- Prat, R. and J.C. Roland.** 1971. Etude ultrastructurale des premiers stades de neoformation d'une enveloppe par les protoplastes vegetaux separees mecanique de leur paroi. *C. R. Acad. Sci. Paris* **273**: 165-168.
- Quail, P.H.** 1979. Plant cell fractionation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30**: 425-484.
- Ray, P.M., T.L. Shininger and M.M. Ray.** 1969. Isolation of β -glucan synthetase particles from plant cells and identification with Golgi membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **64**: 605-613.
- Robenek, H. and E. Peveling.** 1977. Ultrastructure of the cell wall regeneration of isolated protoplasts of *Skimmia japonica* Thunb. *Planta* **136**: 135-145.
- Robinson, D.G.** 1977. Plant cell wall synthesis. *Adv. Bot. Res.* **5**: 89-151.
- Robinson, D.G. and R.D. Preston.** 1972. Plasmalemma structure in relation to microfibril biosynthesis in *Oocystis*. *Planta* **104**: 234-246.
- Roland, J.C.** 1973. The relationship between the plasmalemma and the plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.* **36**: 45-92.
- Sekhar, K.N.C. and V.K. Sawheney.** 1985. Ultrastructure of the shoot apex of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Am. J. Bot.* **73**: 1813-1822.
- Tanchak, M.A., L.G. Griffing, B.G. Mersey and L.C. Fowke.** 1984. Endocytosis of cationized ferritin by coated vesicles of soybean protoplasts. *Planta* **162**: 481-486.
- Van der Valk, P. and L.C. Fowke.** 1981. Ultrastructural aspects of coated vesicles in tobacco protoplasts. *Can. J. Bot.* **59**: 1307-1313.
- Van der Valk, P., P.J. Rennie, J.A. Connolly and L.C. Fowke.** 1980. Distribution of cortical microtubules in tobacco protoplasts: An immunofluorescence microscopic and ultrastructural study. *Protoplasma* **105**: 27-43.
- Withers, L.A. and E.C. Cocking.** 1972. Fine-structural studies on spontaneous and induced fusion of higher plant protoplasts. *J. Cell Sci.* **11**: 59-75.
- Williamson, F.A., L.C. Fowke, G. Weber, F. Constabel and O. Gamborg.** 1977. Microfibril deposition on cultured protoplasts of *Vicia hajastana*. *Protoplasma* **91**: 213-219.

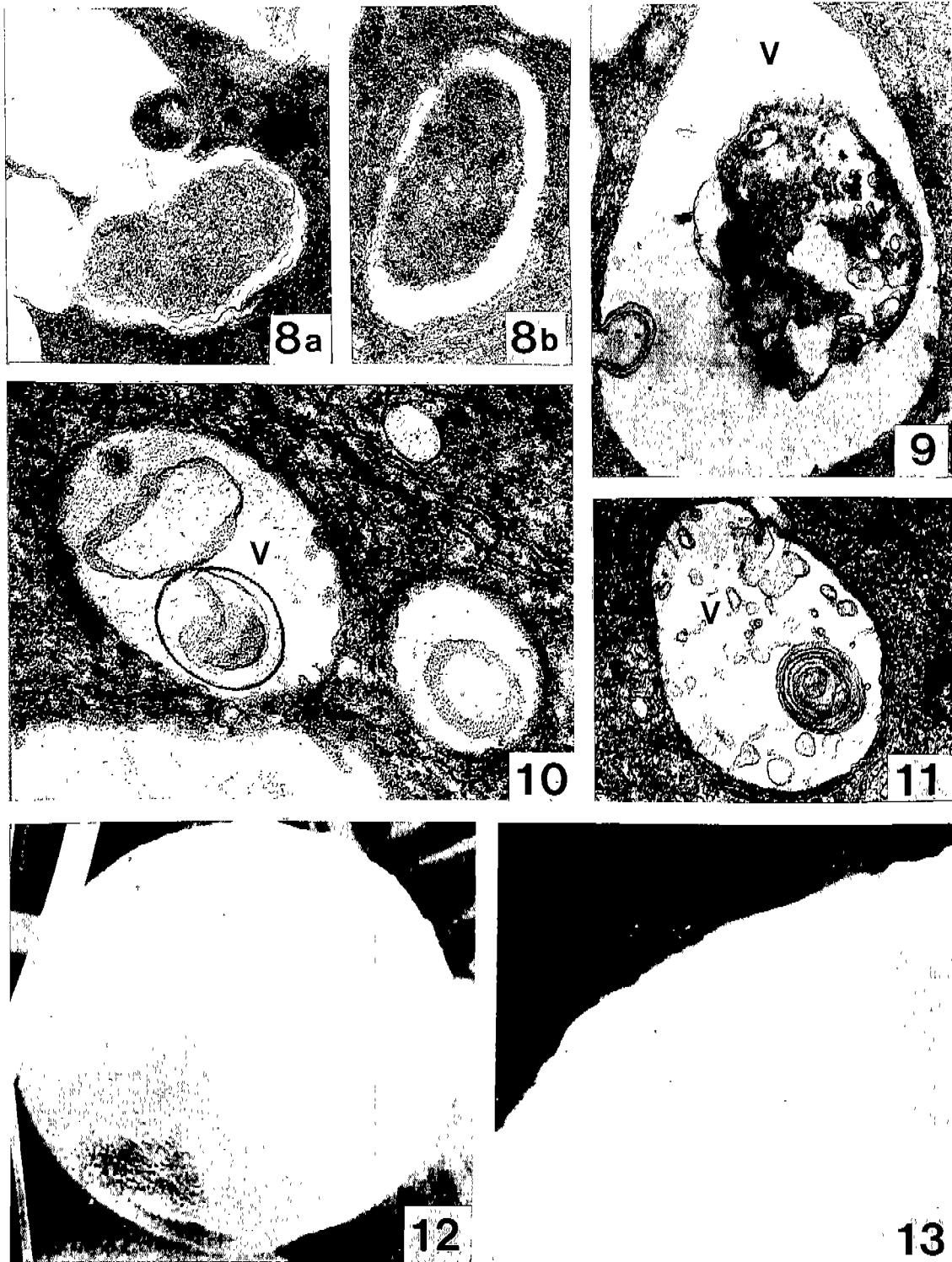
(1994. 1. 24 接受)



Figs. 1-3. Transmission electron micrograph of callus cells. Fig. 1. The callus cell has a large central vacuole, a thin layer of peripheral cytoplasm (Cy), and thick cell wall (CW). $\times 2000$. Fig. 2. The thin layer of cytoplasm contains various cell organelles such as nucleus (N), mitochondrion (M), and plastid (P). $\times 2700$. Fig. 3. Plasmodesma (Pd) between two callus cells. N, nucleus; V, vacuole. $\times 2700$.

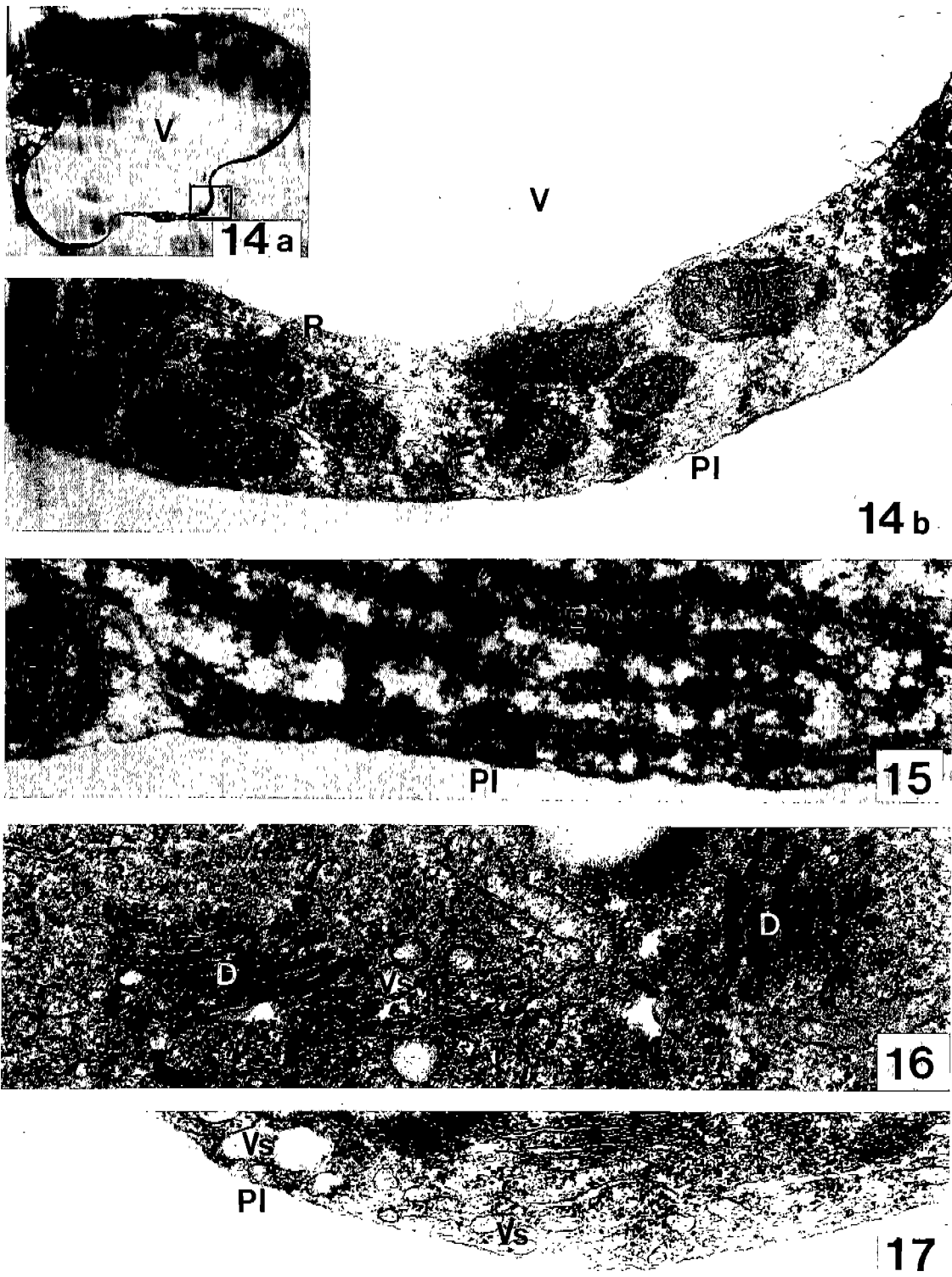


Figs. 4-11. Transmission electron micrograph of freshly isolated protoplasts. Fig.4a. An isolated, spherical protoplast lacking the cell wall and surrounded by only plasmalemma (PI). $\times 2000$. Fig.4b. High magnification of Fig.4a. This cell has densely stained cytoplasm and numerous small vacuoles (V). $\times 7000$. Fig.5. Smooth endoplasmic reticulum (s-ER) is arranged parallelly to the plasmalemma (PI). $\times 27,000$. Fig.6. A part of cytoplasm is sequestered by s-ER, cytosegresome. $\times 27,000$. Fig.7. Cytosegresomes surrounded by s-ER $\times 27,000$.



Figs. 8a, b. Cytosomes surrounded by s-ER $\times 20,000$, $\times 20,000$. Figs. 9-11. Vacuoles (V) are formed by autolysis of the part of cytoplasm in cytosomes. $\times 27,000$, $\times 20,000$, $\times 20,000$.

Figs. 12-13. Scanning electron micrograph of freshly isolated protoplasts. Fig. 12. An isolated protoplast shows a typically spherical shape. $\times 3000$. Fig. 13. High magnification of Fig. 12, showing the smooth surface of protoplast. $\times 10,000$.



Figs. 14-21. Transmission electron micrograph of cultured protoplasts. Fig. 14a. An ovoid shaped cultured protoplast. $\times 600$. Fig. 14b. Enlarged view of the area marked by a rectangular in Fig. 14a, shows the thin-layered cytoplasm containing numerous mitochondria (M) and ribosome (R). $\times 40,000$. Fig. 15. Rough endoplasmic reticulum (r-ER) is arrayed parallelly to the plasmalemma (PI). $\times 27,000$. Fig. 16. Vesicles (Vs) were formed at the maturing face of dictyosomes (D). $\times 80,000$. Fig. 17. Vesicles (Vs) are derived from dictyosomes near the plasmalemma (PI). $\times 60,000$.

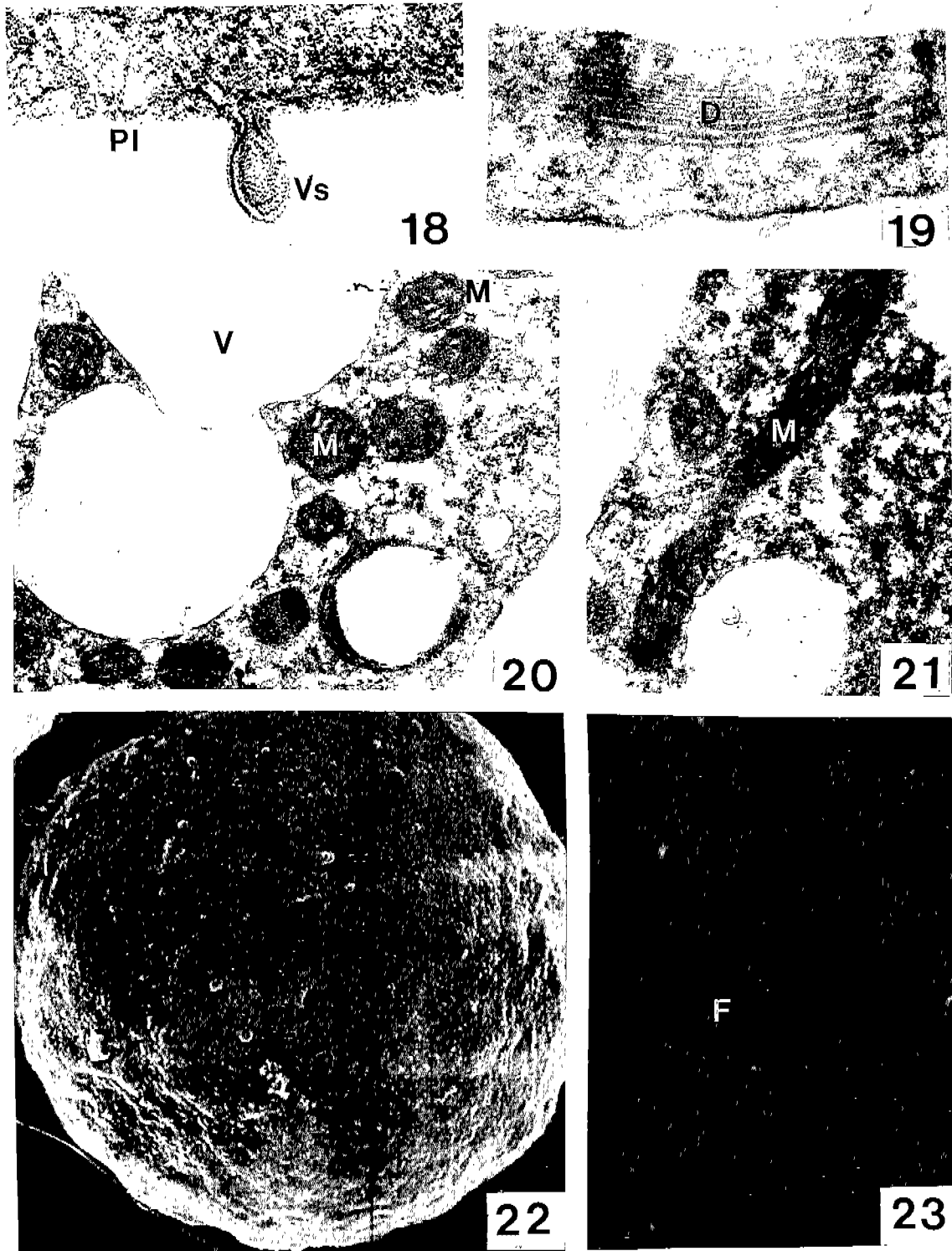


Fig. 18. A region of plasmalemma (PI) is protruded toward the outer surface. Note the protuberance has a vesicle (Vs). $\times 80,000$. Fig. 19. The expanded cisternae at the maturing face of dictyosome (D). $\times 27,000$. Fig. 20. Mitochondria (M) in a spherical shape. $\times 20,000$. Fig. 21. Mitochondria (M) in an elongated shape. $\times 20,000$. Figs. 22-23. Scanning electron micrograph of cultured protoplasts. Fig. 22. Protoplast after 12 h of culture. Protuberances (arrows) are prominent at the surface of plasmalemma. $\times 3000$. Fig. 23. Protoplast after 1 day of culture. The protoplast surface is covered with numerous protuberances which appear to be interconnected each other by fibrils (F) like thread. $\times 20,000$.

An Electron Microscopic Study on Isolated and Cultured Protoplasts
from *Panax ginseng* Callus

Park, Jong-Bum*

Department of Biology, Pusan Women's University, Pusan 607-737, Korea

ABSTRACT

Ultrastructural changes of the isolated and cultured protoplasts from ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) rhizome-callus were studied with transmission and scanning electron microscopy. The freshly isolated protoplasts contained much more small vacuoles, smooth endoplasmic reticulum, and cytosegresomes than callus cells. The smooth endoplasmic reticulum were arrayed parallelly to the plasmalemma, and often surrounded a portion of cytoplasm from which cytosegresomes were formed. The cytosegresomes transformed into vacuoles. In the cultured protoplasts, the cell organelles such as rough endoplasmic reticulum, dictyosome, ribosome, mitochondrion, proplastid, and vacuole were obviously increased in number as compared with those of the isolated protoplasts. Vesicles derived from the dictyosome were evenly distributed in the cytoplasm. Some of such vesicles were involved in the protuberances, which were formed by outgrowth of a portion of cytoplasm limited by plasmalemma. Fibrils observed on the outer surface of the cultured protoplasts were interpreted as the component of new cell walls.

Key words : *Panax ginseng*, protoplast, ultrastructural changes, cytosegresome, fibril

*Corresponding author : Fax +82-51-305-5206