

無窮花의 花粉形成 및 花粉壁의 分化發達

金美貞·金仁仙*

啓明大學校 自然科學大學 生物學科

무궁화(*Hibiscus syriacus* L.) 화분의 형성과 분화발달 과정을 광학현미경, 투과 및 주사전자현미경 등으로 연구하였다. 초기 화분낭시원체는 세포분열에 의해 표피계, 포원조직, 결합조직으로 되고, 포원조직은 융단조직과 생식세포인 화분모세포를 형성하였다. 특히 조밀한 세포질과 많은 세포내소기관을 포함하는 융단조직세포와 화분모세포에는 핵 주위에 매우 많은 소액포들이 분포하였고, 이들 세포 사이에 많은 원형질연락사가 관찰되어 이들 간의 구조 및 기능적인 밀접한 관계가 추정되었다. 화분모세포가 감수분열을 수행하는 동안 이들 세포 주위에 callose가 쌓이기 시작하였고 분열이 끝나 사분체가 되면 callose는 각각의 화분립을 두껍게 포위하였다. 이때 각각의 화분립에서 화분벽 발달이 시작되는데, 세포막으로부터 probacule이 형성되기 시작하여 bacule과 tectum으로 구성된 sexine층을 일차적으로 형성하였다. Callose가 분해되면서 화분벽은 nexine 1, nexine 2, intine층의 순서로 발달하였고 nexine층은 intine층보다 두껍게 분화하였다. 화분내벽인 intine층의 발달이 끝난 후 표면구조인 발아공과 돌기가 tectum 위에 형성되었고, 발아공(ca. 2-3 μm)은 비교적 규칙적인 나선상 형태로 화분표면에 50여개 분포하였다. 돌기는 약 4-9 μm 과 15-20 μm 길이의 이형구조를 이루었고 기저부의 돌출구조는 관찰되지 않았다. 화분형성과정을 끝낸 성숙한 화분의 크기는 약 170 μm 이고 120여개의 돌기가 관찰되었다. 본 연구에서 밝혀진 화분의 크기와 모양, 화분벽의 구조와 형태, 발아공 및 돌기의 특성 등을 *Hibiscus*속에서 알려진 진화적 추이와 비교하여 볼 때 *H. syriacus*는 同屬내에서 비교적 진화된 화분의 특성을 지니고 있는 것으로 추정되었다.

주요어: 화분형성과정, *Hibiscus syriacus*, 미세구조, 화분벽의 분화발달

피자식물의 응성배우자체인 화분은 생식시기에 수술의 화분낭에서 형성되며, 성숙하여 개화 및 수분이 진행될 때까지 외부환경에 그대로 노출되기 때문에 그들 자신을 보호하기 위한 특이한 외부형태 및 내부구조를 발달시킨다. 화분의 생성은 화아속의 화분낭시원체를 기점으로 여러 단계를 거쳐 생식기능을 지닌 화분립이 형성되기까지 일련의 복잡한 과정을 거친다. 특히 화분은 화분모세포의 감수분열에 의해 형성되고, 화분립의 분화 발달에 필요한 영양은 이들을 둘러싸고 있는 융단조직의 세포로부터 공급받는 것으로 알려져 있다(Heslop-Harrison, 1971; Esau, 1977). 융단조직은 특징에 따라 아메바형과 분비형으로 구별되는데(Heslop-Harrison, 1971; Esau, 1977) 식물군에 따라 그 유형은 각기 다르게 나타난다(Echlin and Godwin, 1968; Mephram and Lane, 1969; Esau, 1977; Heslop-Harrison, 1971; Rowley *et al.*, 1992).

외부환경에 노출되는 자신을 오랜기간 동안 보호하기 위하여 화분이 분화 발달시키는 대표적인 특이구조는 화분벽으로서 식물체의 그 어느 부분에서도 발견할 수 없는 특성을 지니고 있다. 화분벽은 화분모세포에서 사분체가 형성되어 callose에

의해 둘러싸일 때 발달하거나(Erdtman, 1969; Heslop-Harrison, 1971; Takahashi and Kouchi, 1988), callose가 분해된 이후 발달되기도 한다(Robertson, 1984). 또한 화분벽은 식물군에 따라 매우 다른 양상을 나타내어 외벽 및 내벽내의 여러 층의 유무, 두께, 모양 등의 뚜렷한 구조적 차이를 보이고 있다(Blackmore and Barnes, 1990). 화분벽의 연구는 전자현미경의 발달과 함께 Larson과 Lewis(1961), Chambers와 Godwin(1961)의 연구를 시초로 다양한 식물군에서 계속되고 있으며(Takahashi and Kouchi, 1988; Takahashi and Skvarla, 1990; Hess, 1993), 특히 화분낭시원체로부터 완전히 성숙한 화분이 형성되기까지의 전 발달과정에 관한 연구는 더욱 활발히 진행되고 있다(Rowley and Skvarla, 1987; Skvarla and Rowley, 1987; Takahashi, 1987; El-Ghazaly and Jensen, 1990; Takahashi and Skvarla, 1991; Uehara, 1991; Perez-Munoz *et al.*, 1993). 이러한 연구들에 의해 화분벽의 형태 및 구조적 발달이 명확히 구분되고 있고, 화분의 발달 뿐만 아니라 화분을 둘러싸고 있는 주위의 융단조직세포나 내피조직의 발달 과정까지도 단계별로 분석됨으로써 많은 화분학적 정보들이 밝혀지고 있다.

피자식물내 아욱과(Malvaceae) 식물종들의 화분은 비교적 다양한 크기와 외부구조를 갖는 것으로 알려져 있다. Christensen(1986)은 화분의 크기, 화분 표면의 발아공과 돌기의 특성,

*교신저자: Fax (053) 580-5164
© 한국식물학회 [서울] 1995

그리고 화분벽의 구성 등 외부형질들을 중점적으로 비교연구하여 group내에서의 진화적 추이를 추정하기도 하였다. 이들 중 가장 다양한 화분의 형태를 지니는 것으로 알려진 *Hibiscus*속은 일부 종의 수분생식기작(Spira, 1989; Snow and Spira, 1993)과 화분벽형성 연구(Takahashi and Kouchi, 1988) 외에는 화분형성의 전 발달과정이 거의 연구되어 있지 않은 실정이다. 이에 본 연구는 동북아시아내에 분포하는 *Hibiscus*속의 대표적 식물인 무궁화(*Hibiscus syriacus* L.)를 연구대상으로 하여 미성숙 화아내 화분낭시원체에서부터 성숙된 화분립의 형성은 물론 화분벽의 분화발달에 이르기까지의 전 분화과정을 단계별로 밝혀보고자 하였다. 이를 위해 광학현미경은 물론 투과 및 주사전자현미경을 함께 이용하였으며, 본 연구에서 밝혀지는 특성들은 *Hibiscus*속에서 화분의 형태 및 미세구조적 특성에 의해 알려진 진화적 추이와 비교되었고, 이를 토대로 *H. syriacus*의 group내에서의 위치 및 진화적 경향을 밝혀보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

크기와 성장단계별로 유사한 무궁화(*Hibiscus syriacus* L.)의 화아들을 1994년 6월에서 동년 9월까지 대구광역시 계명대학교 성서캠퍼스 및 대구 근교에서 채집하였다. 1-5 mm에 이르는 화아들을 크기별로 채취하여 실험에 사용하였으며, 5 mm 이상의 화아일 경우에는 0.2-1 mm 크기의 화분낭을 적출하여 실험재료로 사용하였다.

광학 및 투과전자현미경적 방법

각 크기별 화아와 화분낭을 1% paraformaldehyde와 3% glutaraldehyde의 혼합액에서 전고정(실온, 3시간)과 2% OsO₄에서 후고정(4°C, overnight)하였고, 매 고정 후 0.1 M Na-cacodylate buffer(pH 7.4)로 세척하였다(Karnovsky, 1965). 세척된 시료는 alcohol series로 탈수되어 치환과정을 거친 후, Spurr's resin (1969)에 포매되어 60°C에서 48시간 중합되었다. 이들 시료를 Ultracut-S ultramicrotome에 의해 후박절편(1-2 μm)과 초박절편(80-90 nm)으로 제작한 후 후박절편은 toluidine blue로 염색시켜 Zeiss Microscope으로, 초박절편은 2% uranyl acetate와 lead citrate에 각각 15분씩 이중염색시켜 Hitachi 710 투과전자현미경으로 관찰하였다.

주사전자현미경적 방법

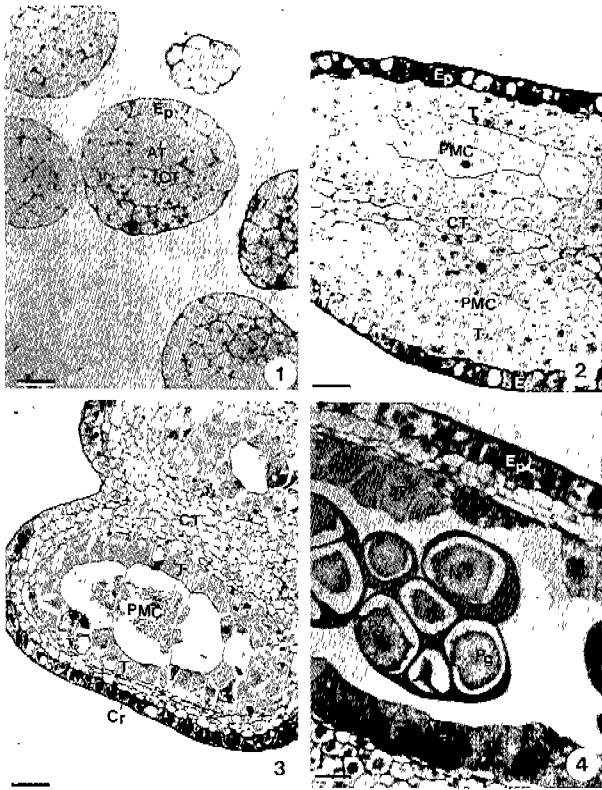
개화된 꽃에서 적출한 화분 및 화분낭을 Karnovsky(1965) 방법에 따라 1% paraformaldehyde와 3% glutaraldehyde의 혼합액에서 전고정시킨 후 2% OsO₄에서 후고정하였다. 0.1 M Na-cacodylate buffer(pH 7.4)로 세척된 시료는 alcohol series로 탈수하여 4°C에서 보관하였다가 critical point drying과 ion coating을 거쳐 Hitachi S-4100 주사전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

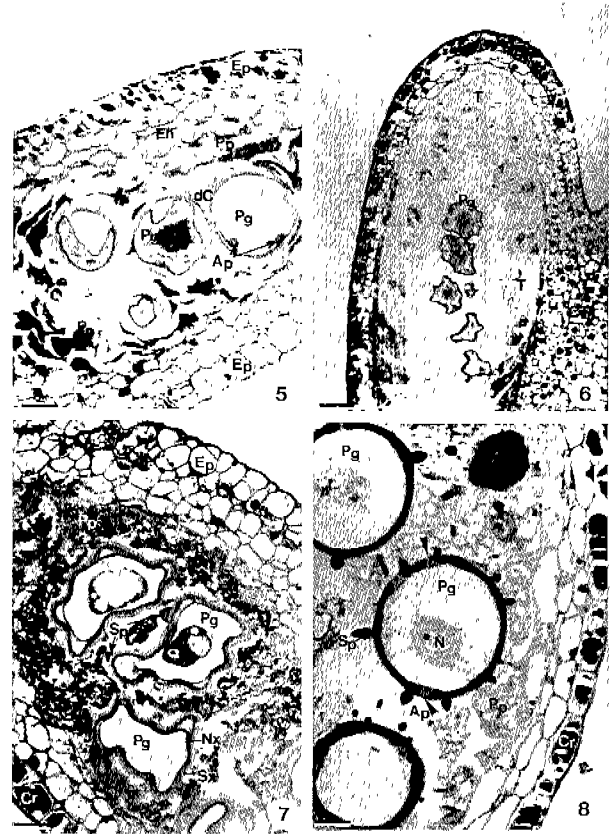
*H. syriacus*의 화분형성과정은 화분낭시원체로부터 완전히 성숙한 화분이 형성되기까지 복잡한 여러 과정을 거치는데 그 과정은 다음과 같으며, 이의 설명에 필요한 용어는 Erdtman (1969)과 Esau(1977) 등의 것을 인용하였다. 또한 식물종에 따라 다른 구조를 가지는 것으로 알려진 화분벽은 여러 학자들에 의해 화분벽층의 구분과 용어가 다양하게 사용되어 왔으나, 본 연구에서는 널리 사용되는 Faegri와 Inversen(1964)과 Erdtman(1969) 중 Erdtman(1969) 방식을 인용하여 화분벽을 크게 표벽(exine)층과 내벽(intine)층으로 구분하고, 전자는 다시 외표벽(sesine)층과 내표벽(nesine)층으로 구분하였다.

광학현미경적 관찰

*H. syriacus*의 화분낭시원체(anther primordium)는 세포분열에 의해 표피계, 포원조직, 결합조직 등으로 발달되며 각각의 조직으로 분화되기 위해 다시 분열을 계속하였다(Fig. 1). 표피계는 크고 많은 결정체를 포함한 표피층과 내피를 형성하였고, 포원조직은 세포분열의 결과로 매우 큰 화분모세포(pollen mother cell, PMC)와 융단조직을 형성하였다(Fig. 2). 내피는 2-3층으로 이루어지고 점차 액포화되어 가며 융단조직은 세포질이 짙게 염색되는 세포들로 구성되어 있다. 화분모세포는 감수분열을 수행하여(Fig. 3) 사분체를 형성하였고 callose는 이를 완전히 포위하였다(Fig. 4). Callose가 분해되기 시작하면 융단조직 세포들의 세포벽은 용해되어 화분립 사이로 스며들어가며 화분립이 발달함에 따라 융단조직 세포들은 주변부변형체(periplasmodium)가 되어 화분립 주위에 남아 있었다(Figs. 5, 6). Callose가 완전히 분해되면 화분벽의 발달은 활발히 진행되었고 화분표면에 돌출된 돌기를 형성하기 시작하였으며 극히 일부의 주변부변형체만 화분립 주위에서 관찰되었다(Fig. 7). 돌기가 발달되면서 화분립은 구형으로 되었으며(Fig. 8), 완전히 성숙한 화분의 세포질에는 무수히 많은 amyloplast가 세포질 전체에서 관찰되었다(Fig. 9).



Figs. 1-4. Early stages of microsporogenesis. LM. Fig. 1. Anther primordia exhibiting epidermal (Ep), archesporial (AT) and connective tissue (CT). Bar=1.5 μ m. Fig. 2. An anther with PMCs (pollen mother cells) and tapetum (T) separated by connective tissue. Tapetum begins to surround the PMCs. Bar=1.5 μ m. Fig. 3. Dark stained tapetal cells around large PMCs undergoing meiosis. Bar=3 μ m. Fig. 4. Included tetrads in a callosic wall (C) separated from the tapetum layer. Notice dark stained cytoplasm of tapetum and crystal bodies (Cr) in the epidermis (Ep). Bar=3 μ m.



Figs. 5-8. Further development of microsporogenesis within the anther sac. LM. Fig. 5. Dissolved callosic walls, and degraded tapetum that remained as periplasmodium (Pp). Notice the pollen grain with two developing apertures (arrows, Ap) at the right. Bar=1.5 μ m. Fig. 6. Pollen grains (Pg) without callosic and the amoeboid tapetum whose cell wall has been dissolved. Bar=3 μ m. Fig. 7. Initiation and early development of spines (Sp) on the nexine (Nx) and sexine (Sx) of the sporoderm. Bar=1.5 μ m. Fig. 8. Further development of spines and apertures on the pollen surface. Bar=3 μ m.

투과전자현미경적 관찰

단계 I: 화분모세포 분화 단계

표피계에서 형성된 표피층은 많은 결정체를 포함하는 세포들로 발달하고 PMC를 둘러싸고 있는 융단조직은 세포분열을 계속하여 1-2층을 이루는 2핵성 세포들로 분화하였다. 이 단계의 PMC는 크고 조밀한 세포질에 비교적 큰 핵과 수많은 미토콘드리아를 가지고 있었으나, 세포벽은 아직 발달되어 있지 않은 상태이었다(Fig. 10). 세포분열이 끝난 융단조직 세포들은 짙게 염색되는 세포질을 나타내었으며 많은 원형질연락사로 PMC와 연결되고 PMC 바깥쪽에서는 서서히 callose가 쌓이기 시작하였다(Figs. 11, 12). PMC 세포들은 세포분열이 끝난 후에도 서로 분리되지 않았고 일시적으로 세포질에 의해

연결되어 있었으며(cytoplasmic connection, Fig. 13) 감수분열이 완결되어야 사분체로 되었다. 사분체는 callose에 의해 완전히 둘러싸여 있었으며 표벽층이 발달될 primexine matrix를 포함하고 있었다(Fig. 14). 사분체내 화분립의 세포질에서는 핵을 중심으로 형성된 환원형의 소액포(circulated vacuoles) 및 많은 미토콘드리아 등이 관찰되었다(Fig. 15). 이때 사분체는 융단조직으로부터 분리되기 시작하였고 융단조직의 세포는 점차 액포화되기 시작하였다(Fig. 16).

단계 II: 화분 형성 단계

사분체 전체가 callose에 둘러싸여 있는 동안 각각의 화분립에서는 원형질막으로부터 외표벽층 구조인 probacule들이

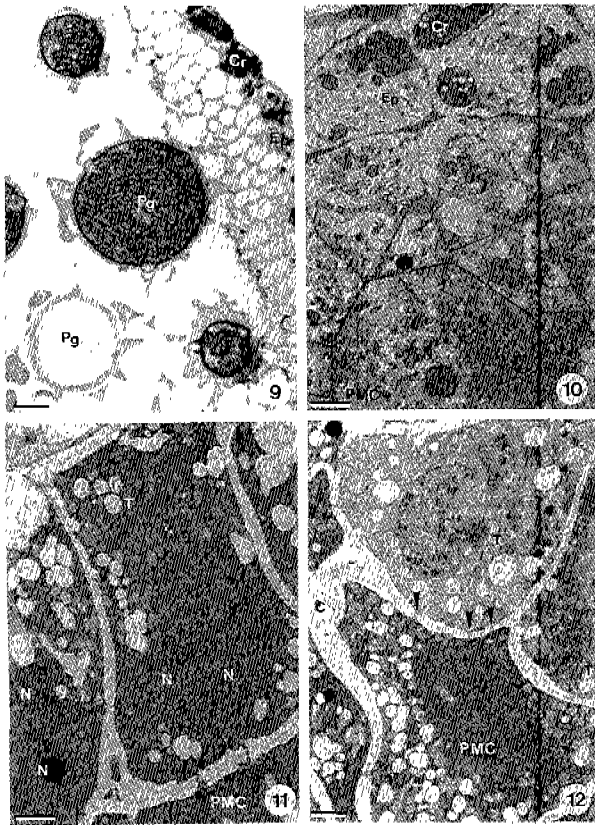
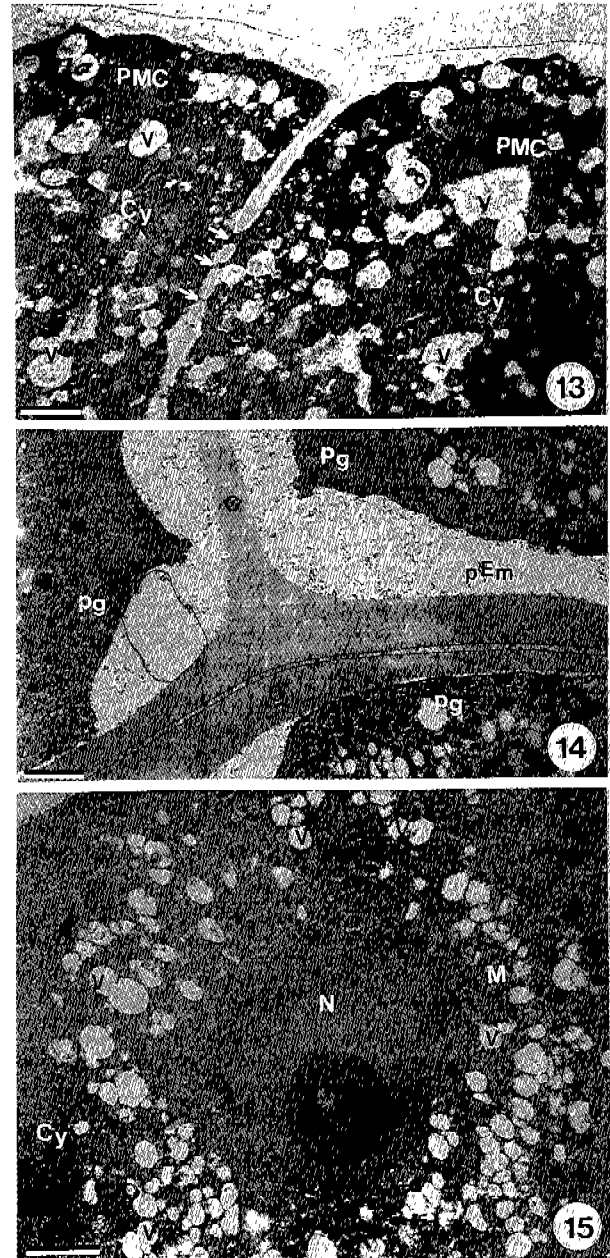


Fig. 9. Mature pollen grains with distinct spines and apertures, and numerous amyloplasts (P) in the cytoplasm. Remnants of periplasmodium still remained around the pollen grains. LM. Bar=3 μ m.

Figs. 10-12. Ultrastructural differentiation of epidermal, tapetal, and PMC in the anther primordium. TEM. Fig. 10. Epidermal cells with crystal bodies, tapetal cells undergoing divisions, and PMC with a big nucleus (N) and abundant mitochondria (M). Bar=3 μ m. Fig. 11. Binucleated tapetal cells. Notice numerous small vacuoles (V) and plasmodesmata between the tapetal cell and a PMC, and between tapetal cells. Bar=2 μ m. Fig. 12. Covering of a callosic wall around PMCs. Arrows indicate plasmodesmata. The cytoplasm (Cy) are all dense. Bar=2.2 μ m.

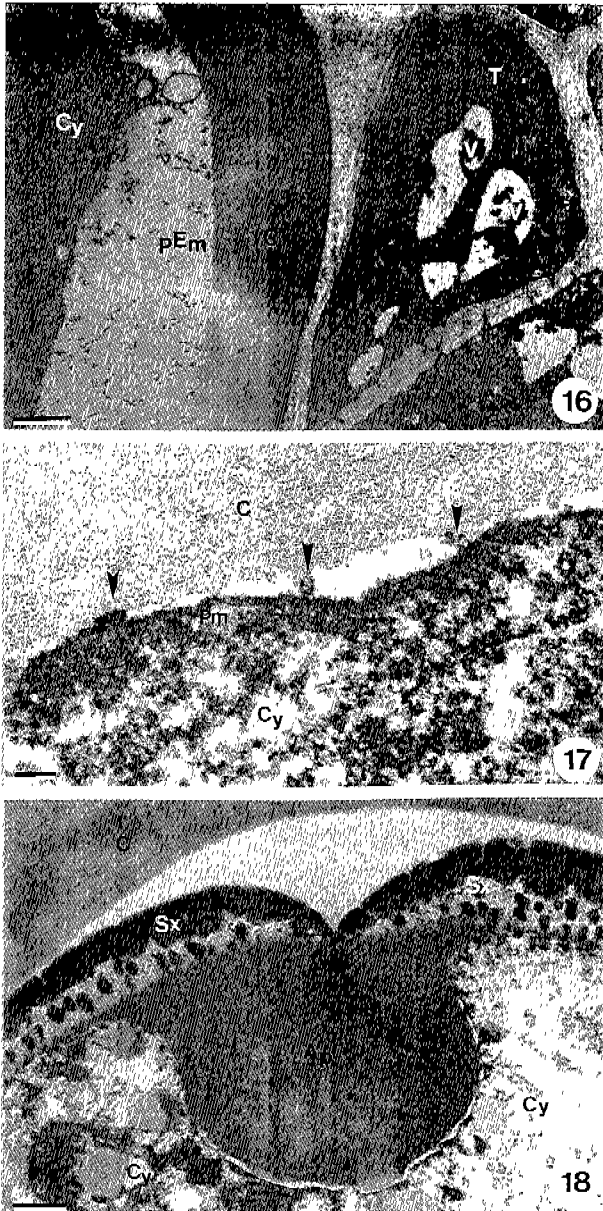
형성되기 시작하였는데(Fig. 17), 이때의 사분체는 융단조직으로부터 완전히 분리된 상태였다. Probacule들로부터 서서히 bacule들이 형성되고 그 위에 tectum이 쌓이면서 화분벽이 급격히 발달하기 시작하였다. 화분내벽에 형성될 발아공강이 발달되고 화분외표벽인 외표벽층 성분은 발아공 이외의 곳에서 축적되어 갔다(Fig. 18). 화분벽성분 축적이 계속되는 동안 각각의 화분립을 둘러싸고 있던 callose는 부분적으로 분해되기 시작하였다(Fig. 19). Callose가 완전히 분해되면 화분은 사분체로부터 분리되고 화분벽의 외벽 및 내벽층의 발달은 활발히 진행되었다.



Figs. 13-15. Detailed structures of PMCs and pollen grains. TEM. Fig. 13. Cytoplasmic connection (arrows) between two PMCs. Notice dense cytoplasm with many, small vacuoles and cellular organelles. Bar=2 μ m. Fig. 14. Tetrads within the boundary of a callosic wall. Primexine matrix (pEm) beneath the callosic wall was detected. Bar=3 μ m. Fig. 15. One of tetrads from Fig. 14, demonstrating circulated vacuoles around the nucleus. Bar=2 μ m.

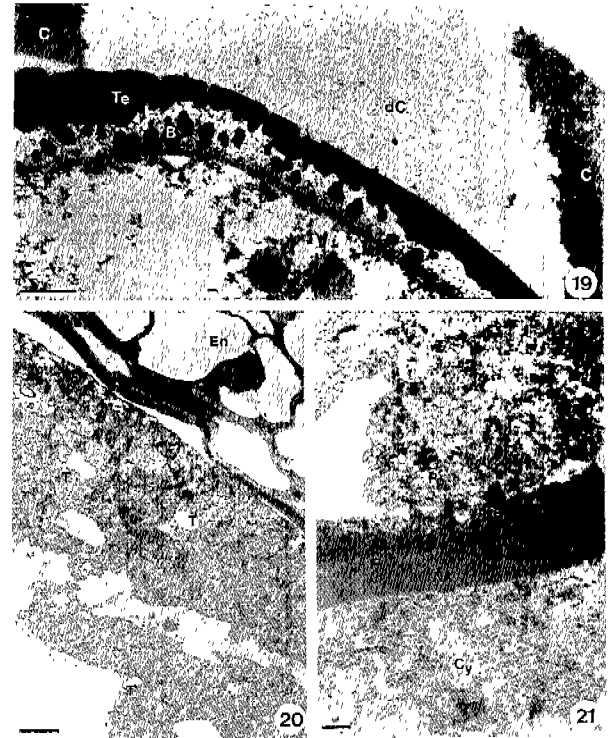
단계 III : 화분벽 발달 단계

화분벽이 형성되는 동안 내피세포는 완전히 액포화되고 융단조직 세포들은 세포벽이 용해되어 화분립 사이로 유입되어



Figs. 16-18. Developmental stage of the sporoderm. TEM. Fig. 16. Separation of tapetum from a tetrad still included in a callosic wall. Only part of a single pollen is shown on the left. Bar=2.6 μ m. Fig. 17. Initiation of probacules from the plasma membranes (arrows, Pm). Bar=350 μ m. Fig. 18. Development of bacules (B) and tectum (Te). Notice the aperture cavity (Ap) where the aperture will be formed. Compare with Fig. 25. Bar=0.9 μ m.

들어가는 아메바형 용단조직 세포들로 변형되었다(Fig. 20). 표벽의 외표벽층은 bacule들과 tectum을 형성하였고 내표벽층은 이들이 형성된 이후 발달하였다. 내표벽층은 두 층으로 발달되어 먼저 흰 선의 lamella층(white-line centered lamellation)으로 된 얇은 foot layer의 내표벽 1층이 형성되고 그 아

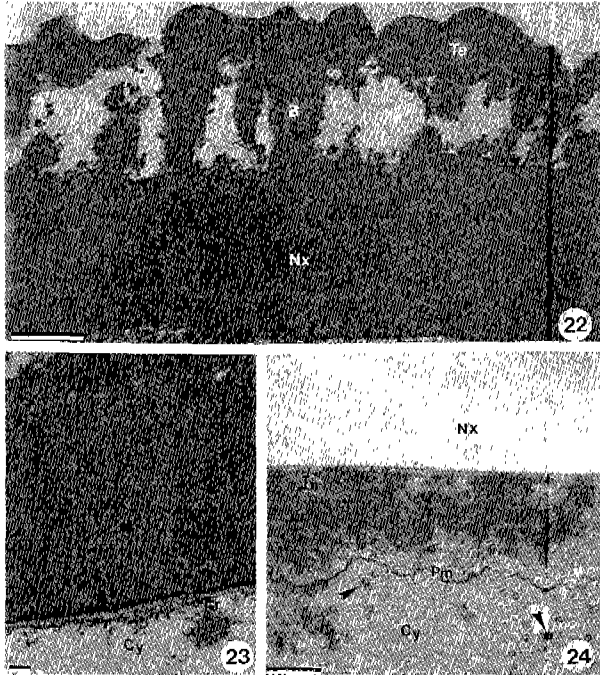


Figs. 19-21. Dissolution of the tapetum and callosic wall around a pollen grain. TEM. Fig. 19. Abrupt dissolution of a callosic wall (dC) over the tectum. Bar=0.7 μ m. Fig. 20. Formation of the amoeboidal tapetum by losing their cell walls. Notice highly vacuolated endoepidermal cells (En) on the top. Bar=2.8 μ m. Fig. 21. Periplasmodium over the tectum and white-lined lamellation of foot layer (F) in nexine. Bar=350 μ m.

래에 내표벽 2층이 발달되었다(Figs. 21, 22). 2-3.5 μ m의 nexine층 형성이 끝나면 0.9-1.5 μ m의 내벽층이 발달되고(Figs. 23, 24) 분화발달을 완전히 끝낸 내벽은 lamella층을 이루었는데 이때 세포질에는 수 많은 미세소관이 관찰되었다(Fig. 24). 화분벽 형성이 완료된 이후 발아공역에는 내표벽층 성분이 쌓이지 않았으며(Fig. 25) tectum층 위로 돌기가 형성되기 시작하고, 화분립 사이에는 용단조직의 변형체인 주변부변형체가 극히 일부만 분포하였다(Fig. 26). 발달중인 돌기는 filament층으로 둘러싸이나(Figs. 27-29), 완전히 성숙된 돌기 주위에는 filament층이 소멸되어 관찰되지 않았다(Fig. 35). 또한 성숙한 화분립내 세포질에는 무수히 많은 미세소관 및 amyloplast가 관찰되었다(Figs. 30 and 31).

주사전자현미경적 관찰

*H. syriacus*의 화분은 큰 구형의 화분으로서 표면에는 많은 수의 돌기와 발아공을 가지고 있었다. 화분은 100-200 μ m의

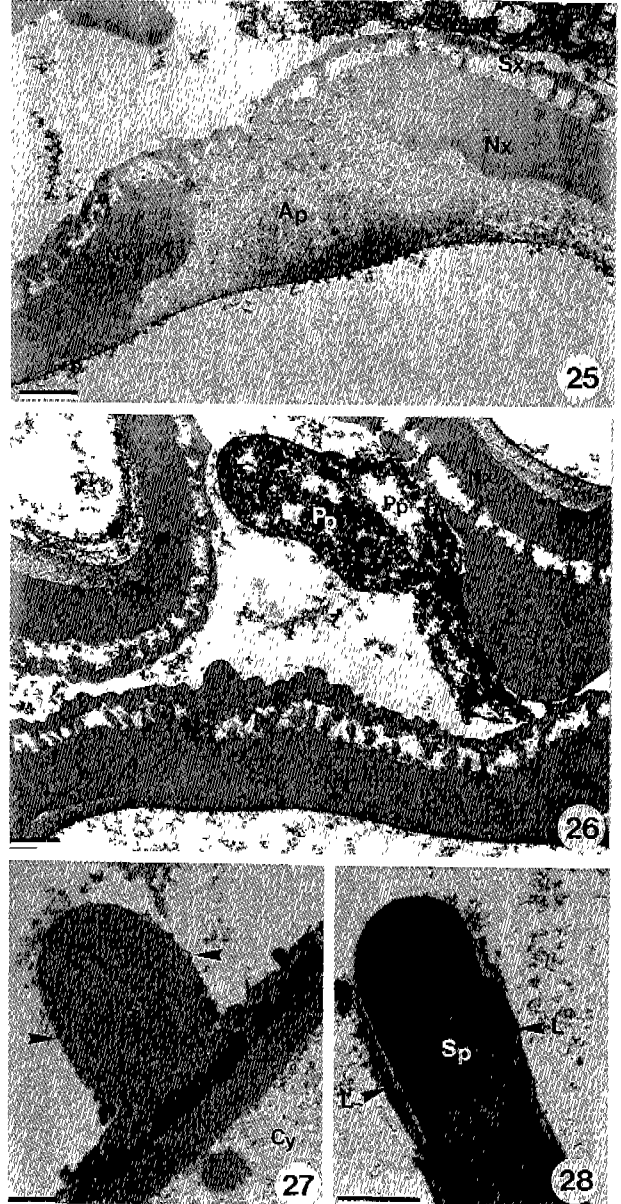


Figs. 22-24. Development of exine and intine layers. TEM. Fig. 22. Well-developed tectum, bacules, foot layer and still growing nexine 2. Bar=370 μ m. Fig. 23. Initiation of intine (arrow head, In) beneath nexine 2 (Nx). Er: Endoplasmic reticulum. Bar=0.3 μ m. Fig. 24. Intine layer with well-developed lamellation. Notice numerous microtubules (arrow heads) in the cytoplasm. Bar=400 μ m.

극대립으로(Figs. 32-34), 15-20 μ m의 긴 돌기와 4-9 μ m의 짧은 돌기 두 종류 약 120개가 표면 전체에 배열하고 있었고(Figs. 32, 34, 35), 2-3 μ m 정도의 발아공 50여개가 화분표면 전체에 비교적 규칙적인 나선상으로 분포하고 있었다(Figs. 32-34). 화분표면은 발아공(Fig. 33)에서 분비된 점액성의 sporopollenin으로 인하여 점차 두껍게 피복되어 나타났다(Figs. 32-34).

고 찰

화분낭을 형성하는 화분낭시원체는 표피계와 포원조직, 그리고 결합조직의 세 부분으로 발달되며(Satina and Blakeslee, 1941; Esau 1977; Koltunow *et al.*, 1990), 표피계에는 표피층과 화분립이 유리될 때 분리될 열개부가 형성된다. 포원조직은 화분모세포가 될 포원세포와 측벽세포로 구분되고, 포원세포에 의해 형성된 화분모세포는 감수분열에 의해 화분으로 분화된다. 측벽세포는 분열을 반복하여 내피와 중간층, 그리고 융단조직으로 발달한다. 결합조직은 유관속초 발달조직이 포함되어 있어 유관속초를 형성하며, 화분낭과 화사를 연결하여 영양분과 물을 공급한다(Heslop-Harrison, 1971; Esau, 1977; Gold-



Figs. 25-28. Development of spines and apertures on the surface of a pollen grain. TEM. Fig. 25. Nexine is not formed over the aperture. This is a later stage of Fig. 18. Aperture cavity no longer exists. Bar=1.7 μ m. Fig. 26. Spine formation over the tectum. Only remnant of the periplasmodium is found between pollen grains. Bar=1.4 μ m. Fig. 27. Spine development showing a sheet of thin film (arrow heads) over the tectum. Bar=0.6 μ m. Fig. 28. Further elongation of a spine with lamellated sheets (L). Bar=1 μ m.

berg *et al.*, 1993). 분화발달이 끝난 화분낭은 화분을 형성하는 생식기능의 구조와 표피, 내피, 융단조직, 유관속조직, 열개부 등의 비생식 기능구조로 구분된다(Goldberg *et al.*, 1993).

대부분의 피자식물에 있어서의 화분발달과정은 화분모세포

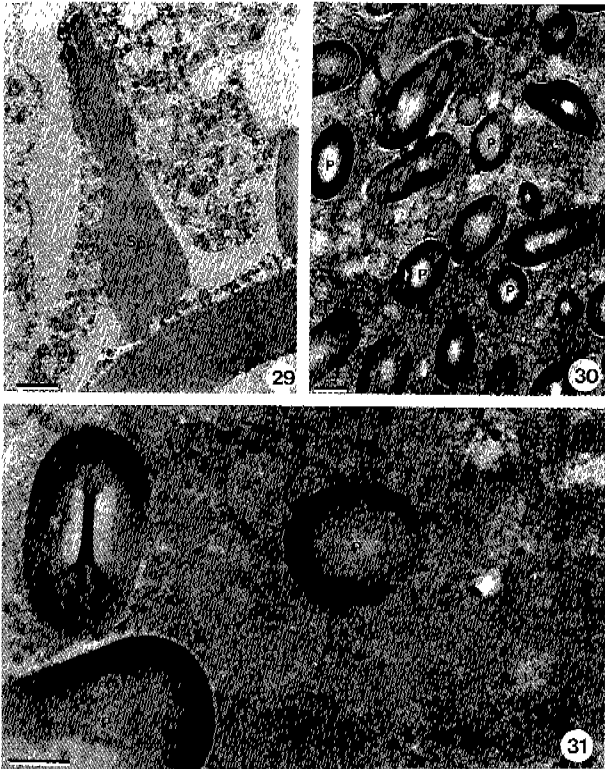
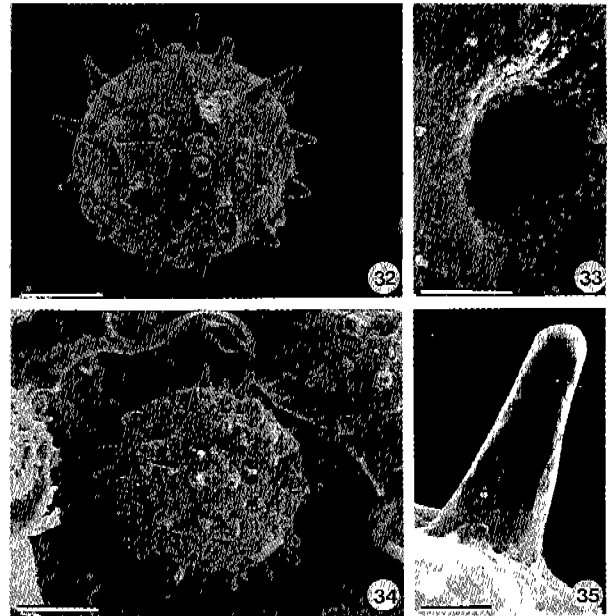


Fig. 29. A well-developed long spine. TEM. Bar=1.8 μ m.
Fig. 30. Cytoplasm of a mature pollen grain with numerous amyloplasts and microtubules. TEM. Bar=1.5 μ m.
Fig. 31. Higher magnification of Fig. 30. Notice a great number of microtubules (arrow heads) in the cytoplasm. TEM. Bar=3 μ m.

가 세포내 소포에서 생성되는 화합물인 β -1,3-linked glucan의 callose벽에 의해 둘러싸이면서 시작된다(Godwin, 1968). 감수분열을 거친 후 두꺼운 callose벽에 의해 둘러싸여 형성되는 사분체는 callose가 분해되면 단핵체인 4개의 소포자로 되어 불균등 체세포분열에 의해 각각의 큰 영양세포와 작은 생식세포가 되는데(Esau, 1977; Tanaka, 1993), *Hibiscus syriacus*의 생식세포는 영양세포에 비해 세포질이 적었고 핵은 짙게 관찰되었다. 포원조직에 의해 분화된 용단조직은 화분모세포가 화분으로 발달될 동안에 필요한 영양분을 공급하며, 사분체로부터 화분이 방출될 때 callase를 분비하여 callose를 분해할 수 있게 한다(Blackmore and Barnes, 1990; Goldberg, 1993). 이러한 용단조직 세포는 분해양상에 따라 2핵성이거나 다핵성 세포들의 분비형 또는 아메바형의 두 가지로 구분되는데(Echlin and Godwin 1968; Mephram and Lane, 1969; Heslop-Harrison, 1971; Esau, 1977; Rowley, 1992), *H. syriacus*의 용단조직은 대핵의 총만된 세포질을 지닌 2핵성 세포들로 구성되어 있는 아메바형의 조직으로 관찰되었다. 아메바형 용단조직은



Figs. 32-35. Surface ornamentation of mature pollen grains. SEM. Fig. 32. Non-acetolyzed pollen grain secreting sporopollenin through apertures (arrow heads). Bar=24 μ m. Fig. 33. Close-up view of a single aperture. Bar=1.5 μ m. Fig. 34. A pollen grain covered with secreted material, sporopollenin. Bar=43 μ m. Fig. 35. Close-up view of a single long spine. Bar=5.5 μ m.

용단세포벽이 분해될 때 화분립 사이로 유입되고 원형질융합에 의해 화분립 주위에 주변부변형체로 되는(Mephram and Lane, 1969; Rowley, 1992) 반면 분비형 용단조직은 원래의 생성부위에 남아 있다가 분해되는 조직으로 알려져 있다(Echlin and Godwin, 1968; Heslop-Harrison, 1971; Esau, 1977). 용단조직은 화분벽이 형성될 때 분비될 sporopollenin과 표벽층 물질을 합성하고 분비하는 역할을 한다고 알려져 있는데(Godwin, 1968; Brooks and Shaw, 1968; Mephram and Lane, 1969; Goldberg *et al.*, 1993). 본 연구에서 관찰된 바와 같이 용단조직 세포와 화분모세포 사이에 원형질연락사가 많이 분포되어 있는 것으로 보아 활발한 물질대사 뿐만 아니라 그들 세포사이의 물질이동이 있을 것으로 추정된다. 또한 용단조직은 화분이 성숙함에 따라 주변부변형체로 변화되는데 이 조직은 화분의 성장기간 동안 계속하여 영양분을 전달시켜 주는 중요한 역할을 하며(Mephram and Lane, 1969; Heslop-Harrison, 1971; Esau, 1977), *H. syriacus*의 경우에 있어서도 화분이 성숙 개화되는 시기까지 화분 주위에서 계속 분포하는 것으로 확인되었다.

감수분열시기의 화분모세포를 서서히 둘러싸기 시작하는 callose는 감수분열 후 사분체를 두껍게 포위하는데 이는 소

포자를 분리시키기 위한 구획의 역할을 하는 것으로 믿어지고 있다(Golberg *et al.*, 1993). 또한 callose벽은 미성숙된 상태로 방출된 사분체가 비정상적으로 표벽층을 발달시키거나 또는 소포자 파괴를 초래할 수 있기 때문에 이를 방지하기 위해 사분체 주위를 둘러싸 정상적으로 발달할 수 있게 하는 틀 구조의 역할을 하기도 한다(Worrall *et al.*, 1992). 화분벽의 형태는 callose에 싸여 있을 때 결정되거나(Godwin, 1968; Goldberg, 1993), 사분체가 용단조직으로부터 분리되면서 표벽층이 발달되기도 하는데(Mephram and Lane, 1968; Robertson, 1984), *H. syriacus*의 경우에는 화분벽이 callose에 의해 둘러싸여 있을 때 외표벽층이 발달되며, callose가 분해된 이후에 내표벽층과 내벽층이 발달하였고 그 이후에 외표벽층 표면에서 돌기가 형성되었다. 화분벽의 분화 발달은 사분체 초기 화분벽의 원형질막으로부터 probacule들이 형성되면서 시작되며(Takahashi and Skvarla, 1991; Takahashi, 1993), 특히 원형질막은 callose와 primexine deposition에도 깊이 연관되어 있는 것으로 알려져 있다(Blackmore and Barnes, 1990). *H. syriacus*의 화분에서는 probacule에서 점차 bacule로 발달되면서 tectum이 형성되었고 bacule들이 완전히 성숙한 후 tectum도 두꺼워졌다. 이러한 bacule들과 tectum이 포함된 외표벽층이 형성되면 외표벽층 바로 아래 부위에서 원선들이 가늘게 배열된 듯한 층판구조를 이룬 foot layer의 내표벽 1층이 형성되었고 그 아래에 내표벽 2층이 점차로 비후되는 것으로 관찰되었다. 이러한 표벽층은 carotenoid와 carotenoid ester 성분의 복합물질인 sporopollenin이 포함되어 있고 이 물질은 callose벽이 분해된 이후에 화분표벽에 쌓이는 것으로 알려져 있다(Brooks and Shaw, 1968; Heslop-Harrison, 1968; Bedinger, 1992). 특히 primexine은 sporopollenin의 형성과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되어 있다(Blackmore and Barnes, 1990). 초산분해를 거치지 않은 *H. syriacus*의 화분에서는 sporopollenin이 발아공을 통해 분비되어 화분벽 전체를 덮어가는 것으로 관찰되었다.

화분의 발아공은 세포질내에서 소포체가 많이 분포하는 곳에 형성되며 표벽층 물질은 발아공역에는 축적되지 않거나 감소되어 나타난다(Golberg *et al.*, 1993). *H. syriacus*의 발아공역에서는 외표벽층 형성물질이 일부 분포하였으나 두꺼운 내표벽층은 Fig. 25에서와 같이 전혀 관찰되지 않았다. 내벽층은 pectocellulose 성분으로(Bedinger, 1992) Fig. 18에서와 같이 발달 초기에는 발아공역에 쌓였다가 점차 화분벽 전체에 퍼져 나가며(Golberg *et al.*, 1993), 이렇게 초기에 얇게 분포되었던 내벽층은 분화한 후에는 잘 발달된 층판구조로 관찰되었다. 이와 같이 외표벽, 내표벽 1, 내표벽 2, 내벽층의 순서로 화분벽이 발달되면 tectum 위에 돌기가 형성되기 시작하며, 돌기 주위에 lamella층이 형성되고 완전히 성숙되면

lamella층 역시 두꺼워졌다(Takahashi and Kouchi, 1988) 분해되는데 이들의 역할에 대해서는 전혀 알려져 있지 않다. 성숙한 화분벽의 세포질에는 많은 amyloplast가 분포하고 있는 것으로 관찰되었는데 이는 화분벽의 생장에 영양을 제공하는 영양세포의 특징이고 이러한 특성은 다른 식물의 세포질에서도 관찰 보고된 바 있다(Heslop-Harrison, 1968; Sanger and Jackson, 1971a; Clauhs and Grum 1977). 또한 세포질 전반에 수없이 많이 분포하고 있는 미세소관은 영양세포나 정핵세포의 형태형성 및 유지에 관여한다고 알려져 있는데(Sanger and Jackson 1971b; Cass, 1973; Cresti *et al.*, 1984; Tanaka, 1993) 이는 amyloplast와 마찬가지로 영양세포에서 관찰되는 구조라 할 수 있다.

아욱과(Malvaceae)내 식물종들의 화분형태 연구에 의하면(Christensen, 1986) *Hibiscus*속 화분의 크기는 $83 \times 85 - 115 \times 113 \mu\text{m}$ 이고, $3.0 - 9.2 \mu\text{m}$ 크기의 46-93개 발아공과 내표벽층이 외표벽층보다 2배 이상 두꺼운 것으로 보고되어 있다. 이들내 화분특성에 의한 종간의 진화경향은 화분의 크기에 있어서는 medium \rightarrow large, 돌기의 길이는 short \rightarrow long, 외표벽층이 내표벽층보다 두꺼운 것 \rightarrow 내표벽층보다 훨씬 얇은 것, 그리고 발아공 수가 많을수록 진화된 형질을 지닌 종으로 보고되어 있다(Christensen, 1986). Takahashi와 Kouchi(1988)는 *H. syriacus*의 spinous exine 연구에서 $150 - 200 \mu\text{m}$ 크기의 화분, $15 - 20 \mu\text{m}$ 길이의 돌기 등을 보고하였으나, 본 연구에서 조사된 화분들은 $100 - 200 \mu\text{m}$ 사이에 해당되는 화분으로 평균 $170 \mu\text{m}$ 이었다. 화분은 크기에 의해 대략 6群으로 나뉘는데 일반적으로 $10 \mu\text{m}$ 이하의 극소립, $10 - 25 \mu\text{m}$ 는 소립, $25 - 50 \mu\text{m}$ 는 중립, $50 - 100 \mu\text{m}$ 는 대립, $100 - 200 \mu\text{m}$ 는 극대립, $200 \mu\text{m}$ 이상은 거대립으로 구분된다(Erdtman, 1952). *H. syriacus*의 화분은 비교적 크기가 큰 극대립으로 돌기 및 발아공을 지닌 표면구조 역시 특이한 것으로 관찰되었다. 돌기는 $15 - 20 \mu\text{m}$ 의 긴 것과 $4 - 9 \mu\text{m}$ 의 작은 것의 두 가지형(dimorphic)이 약 120개 분포하였고, 발아공은 $2 - 3 \mu\text{m}$ 크기로서 화분표면에 약 50여개가 관찰되었다. *Hibiscus*속 다른 종들에서 발표되었던 돌기기부의 돌출구조, 또는 발아공에서의 colpus 구조 등은 관찰되지 않았으나 *H. syriacus*의 발아공에는 외표벽층이 부분적으로 분포하며 내표벽층은 발달되어 있지 않았고 세포질내에 수많은 미세소관과 amyloplast가 분포하고 있었으며, 내표벽층이 외표벽층보다 2배 이상 두꺼운 것으로 관찰되었다. 용단조직이 형성된 후 기능을 나타내고 분해될 때 보이는 분해유형 역시 *Hibiscus*에서는 보고된 바 없었는데, 본 연구에서 세포벽이 분해되어 화분벽 사이로 유입되어 들어가는 아메바형으로 조사되었다. 또한 조밀한 세포질을 지닌 용단조직과 PMC세포 사이, 그리고 용단조직 세포들 사이에서 많은 원형질연락사가 관찰되었는데 이것은 이들 사이에 화분형성과정에 필요한 에

너지를 공급하기 위하여 활발한 물질대사와 물질교환이 일어난다는 것으로 추정된다.

이상과 같이 *H. syriacus*의 화분특성을 Christensen(1986)에 의한 Malvaceae내 화분특성과 진화 유연관계에 비추어 볼 때 화분의 크기, 돌기의 길이와 수, 발아공의 수, 화분벽의 외 표벽과 내표벽층 두께 등의 형질로 보아 *Hibiscus*속내에서 비교적 진화된 특징을 가지고 있는 종으로 추정된다. 특히 이들 *Hibiscus*에서는 발아공, 화분벽 구조, 화분의 크기 및 형태 등이 종간에 유용하게 비교되는 형질로 알려져 있다(Christensen, 1986). 그러나 이외의 *Hibiscus*종들의 화분학적 연구들이 수행되어 있지 않은 바 근연의 다른 종들과의 관계를 추정할 수 없으므로 이들 화분벽을 포함한 화분의 내부구조 특성 및 화분형성과정의 연구를 통해 *Hibiscus*내 근연 식물종들의 진화학적 유연관계 연구가 폭넓게 수행되어야 할 것이다.

인 용 문 헌

- Bedinger, P.A. 1992. The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887.
- Blackmore, S. and S.H. Barnes. 1990. Pollen wall development in angiosperms. In *Microspores: Evolution and Ontogeny*. S. Blackmore and R.B. Knox (eds.). Academic Press, New York, pp. 173-192.
- Brooks, J. and G. Shaw. 1968. Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids in nature. *Nature* 219: 532-533.
- Cass, D.D. 1973. An ultrastructural and nomarski-interference study of the sperms of barley. *Can. J. Bot.* 51: 601-605.
- Chambers, T.C. and H. Godwin. 1961. The fine structure of the pollen wall of *Tilia platyphyllos*. *New Phytol.* 60: 393-399.
- Christensen, P.R. 1986. Pollen morphological studies in the Malvaceae. *Grana* 25: 95-117.
- Claushs, R.P. and P. Grun. 1977. Changes in plastid and mitochondrial content during maturation of generative cells of *Solanum* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* 64: 377-383.
- Cresti, M., F. Ciampolini. and R.N. Kapil. 1984. Generative cells of some angiosperms with particular emphasis on their microtubules. *J. Submicroc. Cytol.* 16: 317-326.
- Echlin, P. and H. Godwin. 1968. The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. I. The development of the tapetum and ubisch bodies. *J. Cell. Sci.* 3: 161-174.
- El-Ghazaly, G.A. and W.A. Jensen. 1989. Development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen wall before and after effect of a gametocide. *Can. J. Bot.* 68: 2509-2516.
- Erdtman, G. 1952. Pollen Morphology and Plant Taxonomy of Angiosperms. Almqvist & Wiksell, Stockholm, pp. 11-24.
- Erdtman, G. 1969. Handbook of Palynology: Morphology-Taxonomy-Ecology. Munksgaard, Sweden, pp. 26-46.
- Esau, K. 1977. Anatomy of Seed Plant. 2nd Ed., John Wiley, New York, pp. 403-427.
- Faegri, K. and J. Inversen. 1964. Textbook of Pollen Analysis. 2nd Ed., Blackwell, Oxford, pp. 295.
- Godwin, H. 1968. Pollen exine formation. *Nature* 220: 389.
- Goldberg, R.B., T.P. Beals. and P.M. Sanders. 1993. Anther development: Basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229.
- Heslop-Harrison, J. 1968. Anther carotenoids and the synthesis of sporopollenin. *Nature* 220: 605.
- Heslop-Harrison, J. 1971. Pollen: Development and Physiology. Appleton-Century-Crofts. New York, pp. 41-127.
- Hess, M.W. 1993. Cell wall development in freeze-fixed pollen: Intine formation of *Ledebouria socialis* (Hyacinthaceae). *Planta* 189: 139-149.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137-138.
- Koltunow, A.M., J. Truettner., K.H. Cox., M. Wallroth. and R.B. Goldberg. 1990. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2: 1201-1224.
- Larson, D.A. and C.W. Lewis. 1961. Fine structure of *Parkinsonia aculeata* pollen. I. The pollen wall. *Am. J. Bot.* 48: 934-944.
- Mephram, R.H. and G.R. Lane. 1968. Exine and the role of the tapetum in pollen development. *Nature* 219: 961-962.
- Mephram, R.H. and G.R. Lane. 1969. Role of the tapetum in the development of *Tradescantia* pollen. *Nature* 221: 282-283.
- Perez-Munoz, C.A., J.A. Jernstedt. and B.D. Webster. 1993. Pollen wall development in *Vigna vexillata*. I. Characterization of wall layers. *Am. J. Bot.* 80: 1183-1192.
- Robertson, B.L. 1984. Tapetal cell changes and sporoderm development in *Rhigozum trichotomum*. *Ann. Bot.* 53: 803-810.
- Rowley, J.R., N.I. Gabarayeva. and B. Walles. 1992. Cyclic invasion of tapetal cells into loculi during microspore development in *Nymphaea colorata* (Nymphaeaceae). *Am. J. Bot.* 79: 801-808.
- Rowley J.R. and J.J. Skvarla. 1987. Ontogeny of pollen in *Poinciana* (Leguminosae). II. Microspore and pollen grain periods. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 50: 313-331.
- Sanger, J.M., and W.T. Jackson. 1971a. Fine structure study of pollen development in *Haemanthus katherinae* Baker II. Formation of vegetative and generative cells. *J. Cell Sci.* 8: 289-301.
- Sanger, J.M. and W.T. Jackson. 1971b. Fine structure study of pollen development in *Haemanthus katherinae* Baker III. Changes in organelles during development of the vegetative cell. *J. Cell. Sci.* 8: 317-329.
- Satina, S. and A.F. Blakeslee. 1941. Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of

- leaf and flower. *Am. J. Bot.* **28**: 862-871.
- Skvarla, J.J. and J.R. Rowley.** 1987. Ontogeny of pollen in *Poinciana* (Leguminosae). I. Development of exine template. *Rev. Palaeobot. Palynol.* **50**: 298-311.
- Snow A.A. and T.P. Spira.** 1993. Individual variation in the vigor of self pollen and selfed progeny in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae). *Am. J. Bot.* **80**: 160-164.
- Spira, T.** 1989. Reproductive biology of *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae). In *The Evolutionary Ecology of Plants*. J.H. Abock and Y.B. Linhart. (eds.). Westview Press, London, pp. 227-246.
- Spurr, A.R.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**: 31-43.
- Takahashi, M.** 1987. Development of omniaperture pollen in *Trillium kamschiticum* (Liliaceae). *Am. J. Bot.* **74**: 1842-1852.
- Takahashi, M.** 1993. Exine intiation and substructure in pollen of *Caesalpinia japonica* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Am. J. Bot.* **80**: 192-197.
- Takahashi, M. and J. Kouchi.** 1988. Ontogenetic development spinous exine in *Hibiscus syriacus* (Malvaceae). *Am. J. Bot.* **75**: 1549-1558.
- Takahashi, M. and J.J. Skvarla.** 1990. Pollen development in *Oenothera binnis*. *Am. J. Bot.* **77**: 1142-1148.
- Takahashi, M. and J.J. Skvarla.** 1991. Exine pattern formation by plasma membrane in *Bougainvillea spectabilis* Willd. (Nyctaginaceae). *Am. J. Bot.* **78**: 1063-1069.
- Tanaka, I.** 1993. Development of male gametes in flowering plants. *J. Plant Res.* **106**: 55-63.
- Uehara, K., S. Kurita., N. Sahashi. and T. Ohmoto.** 1991. Ultrastructural study on microspore wall morphogenesis in *Isoetes japonica* (Isoetaceae). *Am. J. Bot.* **78**: 1182-1190.
- Worrall, D., D.L. Hird., R. Hodge., W. Paul., J. Draper. and R. Scott.** 1992. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* **4**: 759-771.

(1995. 2. 20 接受)

Microsporogenesis of *Hibiscus syriacus* L. and Its Sporoderm Differentiation

Kim, Mee-Jung and InSun Kim

Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

ABSTRACT

Complete microsporogenesis of *Hibiscus syriacus* L. were carried out employing LM, TEM, and SEM to investigate the pollen ontogeny that undergoes considerable structural differentiation. The process first began with several cell divisions in the anther primordium that produces 3 different tissues of epidermal, archesporial, and connective tissues. Only archesporial tissue involved further differentiation into the tapetum and formation of reproductive cells, pollen mother cells (PMC). The tapetum and PMC were closely associated with each other structurally and metabolically by exhibiting numerous plasmodesmata, mitochondria, and many small vacuoles in their dense cytoplasm. A callosic wall began to surround the PMC while meiosis took place in the PMC to produce 4 microspores. When thick callose encircled each microspore as a frame, the sporoderm development initiated from the plasma membrane of a pollen grain in a tetrad. The first formed sporoderm layer was bacules and tectum of sexine that originated from the plasma membrane. After the dissolution of a callose, further development of sporoderm continued in the order of nexine 1, nexine 2, and intine layer. The nexine layer was thicker (ca. 2-3.5 μm) than the intine layer whose thickness was about 0.9-1.5 μm . Upon completion of the sporoderm development, that is after intine formation, spines and apertures of pollen surface ornamentation initiated from the tectum. Spines were dimorphic, about 4-9 μm and 15-20 μm in length, and no basal cushion was detected. The mature pollen grains ranged 100-200 μm in diameter, but their average was about 170 μm . About 120 spines were observed over the spheroidal pollen surface. Apertures were simple punctures of 2-3 μm in diameter and about 50 apertures were arranged somewhat helically over the surface. Comparing such features of form and size of the pollen, sporoderm sculpture and structure, and aperture and spine conditions with known evolutionary trends in the genus *Hibiscus*, *Hibiscus syriacus* seemed to possess many advanced features in the sporoderm differentiation.

Keywords : microsporogenesis, *Hibiscus syriacus*, ultrastructure, sporoderm differentiation

*Corresponding author: Fax +82-53-580-5164