

인삼 캘러스 원형질체의 세포분열과 세포벽 재생에 미치는 Dimethylsulfoxide의 효과

이석찬¹ · 이규배² · 박종범*

신라대학교 자연과학과군 생명과학과, ¹성균관대학교 생명공학부 유전공학과, ²조선대학교 사범대학 생물교육학과

Effects of Dimethylsulfoxide on the Cell Wall Regeneration and Cell Division of Protoplasts Isolated from *Panax ginseng* Callus

LEE, Sukchan¹ · LEE, Kyu Bae² · PARK, Jong-Bum*

Department of Life Science, Silla University, Pusan, 617-736, Korea

¹Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon, 440-746, Korea

²Department of Biological Science Education, Chosun University, Kwangju, 501-759, Korea

ABSTRACT Isolated protoplasts from ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) callus tissue were cultured in modified MS media supplemented with various concentrations of dimethylsulfoxide (DMSO). The cell wall regeneration rate and cell division efficiency of the protoplasts were increased significantly by 1% DMSO treatment. However, there was no difference in the viability of protoplasts between the DMSO treatment and non-treatment. Transmission electron microscopy revealed that the microtubules were oriented in parallel manner to the plasmalemma after 3 days of culture in medium with 1% DMSO. Further, interconnected cellulose microfibrils were observed on the outer surface of the 3-day-cultured protoplasts by scanning electron microscopy. These structures shown by electron microscopy were not observed in protoplasts cultured on DMSO-free media. This studies indicates that DMSO supplemented in culture media seemed to stimulate the cell wall regeneration and cell divisions of protoplasts by forming microtubule organizing centers (MTOC).

Key word: Cellulose, microfibril, microtubule, protoplast culture

서 론

식물 원형질체는 세포벽이 제거된 세포인데, 원형질체를 적절한 배양조건에서 배양하면 세포벽이 재생되어 세포분열하기 때문에 이와 관련된 연구에 매우 유용한 실험재료로 사용되고 있다. 많은 식물의 엽육조직으로부터 분리한 원형질체를 배양하였을 때 배양 1주일 이내에 새로운 세포벽이 재생되었음이 보고되었다 (Horine and Ruesink 1972; Robenek and Peveling 1977). 특히 담배 (*Nicotiana tabacum*) 엽육조직으

로부터 분리한 원형질체를 적절한 배양배지에서 배양하였을 때 세포벽이 재생되어야만 세포분열이 일어났음이 관찰되어 세포벽 재생이 원형질체의 배양에 있어서 선행 필수조건임이 보고되었다 (Schilde-Rentschler 1977). 한편 캘러스세포로부터 분리한 원형질체를 배양하였을 때에는 원형질체의 세포분열이 일어나지 않는 경우가 관찰되어 이에 관한 문제점에 대해 많은 연구보고가 있었다 (Rose 1980; David et al. 1982; Evans and Bravo 1983). Hahne와 Hoffmann (1984)은 무궁화속의 1종인 *Hibiscus rosasinensis*의 캘러스로부터 분리한 원형질체를 배양하였을 때 원형질체의 분열이 일어나지 않는 이유를 두 가지 원인 때문이라고 주장하였다. 이들은 두 가지 원인을 원형질체 분리과정 중 처리한 효소와 효소 내의 불순물에 의해 세포가 손상을 입었을 경우와, 원형질체 분리과정

*Corresponding author. Tel 051-309-5472 Fax 051-309-5176
E-mail jbpark@silla.ac.kr

중 탈수에 의하여 세포 형태가 변하므로써 세포질 내에 존재하는 미소관 (microtubles)들이 무질서하게 배열되는 경우로 설명하고 있다. 이들은 그 중 특히 무질서하게 배열된 미소관들을 다시 정상적인 기능을 갖는 미소관으로 재배열시키지 못하면 분열이 억제된다고 설명하여 이것이 원형질체 분열에 가장 큰 영향을 끼친다고 보고하였다 (Hahne and Hoffmann 1984). 무질서하게 배열된 미소관들은 배지 내에 dimethyl-sulfoxide (DMSO)를 첨가함으로써 다시 재배열될 수 있는데, 이는 DMSO가 첨가된 배지에서 미소관의 소단위인 tubulin이 microtubule-associated-proteins (MAPs) 없이도 미소관으로 self-assembly된다는 연구보고 (Himes et al. 1977; Robinson and Kristen 1982)에 근거하고 있다. 이러한 보고를 통하여 본 실험에서는 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 캘러스 조직으로부터 분리한 원형질체를 배양하면서 배지 속에 첨가된 DMSO가 원형질체의 세포벽 재생과 세포 분열에 미치는 영향을 알아보고, 원형질체 배양에 적절한 DMSO의 농도를 조절하여 줌으로써 원형질체의 지속적인 성장 및 분화를 유도할 목적으로 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

4~5년생 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 뇌두 조직편을 배양하여 유도한 캘러스 조직을 MS고체배지에서 계대 배양하여 원형질체 분리 및 배양의 실험재료로 사용하였다.

원형질체 분리 및 배양

0.5% macerozyme R-10 (Yakult Biochemical Co.)과 1.5% cellulase "onozuka" R-10 (Yakult Biochemical Co.)가 첨가된 효소용액 10 mL을 50 mL Erlenmeyer flask에 넣고 그 속에 캘러스 조직 1 g을 넣어서 27~28°C에서 3~5시간 진탕 (45~50 rev/min.)시켰다. 진탕 후 얻어진 세포현탁액을 직경 100 μ m pore mesh로 여과시킨 다음 원심분리 (100 \times g, 5분)하였다. 상등액인 효소용액을 제거시킨 후, 나머지 원형질체 침전물은 0.5 M sucrose용액 5 mL로 현탁시키고 그 상층에 0.5 M mannitol용액 1 mL을 첨가한 다음 원심분리 (100 \times g, 5분)하여 살아 있는 원형질체만을 순수분리하였다. 순수분리된 원형질체는 Pasteur pipette을 사용하여 모은 후 MS배지에 1 mg/L 2,4-D, 4 mg/L NAA, 1 mg/L BAP 및 0.4 M mannitol이 첨가된 MS배양액으로 3회 원심분리하여 세척하였다. 원형질체 배양은 liquid-on-agar 배양법을 이용하여 상기의 MS배양액에 여러가지 농도의 DMSO와 0.8% agar를 첨가시킨 원형질체 배양배지를 직경 50 mm plastic petri dish에 2.5 mL 정도 얇게 깔아 굳힌 다음, 원형

질체의 밀도가 5×10^4 - 10^5 /mL인 원형질체 현탁액 1.0 mL를 접종한 후 parafilm으로 밀봉하여 25 \pm 1°C에서 암배양하였다. 배양한 원형질체의 세포벽 재생 여부 측정은 0.1% cellufluor로 30분간 염색한 후 UV-Spectrophotometer를 사용하여 300~400 nm 사이의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

전자현미경 관찰

배양된 원형질체를 원심분리하여 모은 다음 0.4 M mannitol이 첨가된 2.5% glutaraldehyde - 2% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 3시간 전고정한 후 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 용액으로 20분간 3회 세척하였다. 세척된 재료는 상기 buffer로 완충된 1% osmium tetroxide 용액으로 실온에서 3시간 후고정시켰다. 후고정이 완료된 재료는 상기 buffer로 20분간 3회 세척하고 난 후 1 mm³ 크기의 1% agar block을 만들어 ethanol 상승농도순으로 탈수시켜서 propylene oxide로 치환한 다음 Araldite-Epoxy resin을 침투, 포매하였다. Epon 절편은 유리칼을 사용하여 Sorvall ultramicrotome으로 절단하였다. 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 관찰을 위하여는 상기 탈수가 끝난 재료를 여과지 (Whatman No.1)에 올려 N-amylacetate로 치환시켜 CO₂를 이용한 임계점 건조기로 건조시켰고, 동판위에 양면 Scotch tape를 붙이고 그 위에 재료가 붙어 있는 여과지를 부착시켰다. 부착된 여과지 측면에 silver paint로 mounting하였다. 동판에 부착된 재료는 ion spotter에 넣고 gold-paladium으로 이온증착시켜 주사전자현미경 (JEOL EM-ASID-4D)으로 40 kV에서 관찰, 촬영하였다.

결 과

인삼 캘러스 조직으로부터 분리한 원형질체를 배양배지에 DMSO를 0%에서부터 8%까지 11개의 실험구로 처리를 달리한 배지에서 배양하였다. DMSO를 첨가하지 않은 배지에서 24시간 동안 배양한 원형질체는 분리 직후의 원형질체 (Figure 1A)와 거의 유사하게 대부분이 구형의 세포형태를 하고 있었다. 배양 3~4일 후 첫 분열이 일어나기는 하였으나 그 빈도는 7% 이내이며 (Figure 2) 더 이상의 지속적인 분열은 관찰되지 않았다. 또한 세포분열 양상도 세포판 형성에 의한 정상적인 분열보다는 돌기를 형성한 후 세포질이 이동하여 2개의 세포로 나뉘어지는 분열 양상인 출아현상이 많이 관찰되었다(Figure 1B). 그러나 배지에 첨가된 DMSO의 농도가 높아질수록 세포분열이 점차 증가되다가 1% 농도에서 세포분열 빈도가 약 27%로 최대치를 나타내었고 1%보다 더

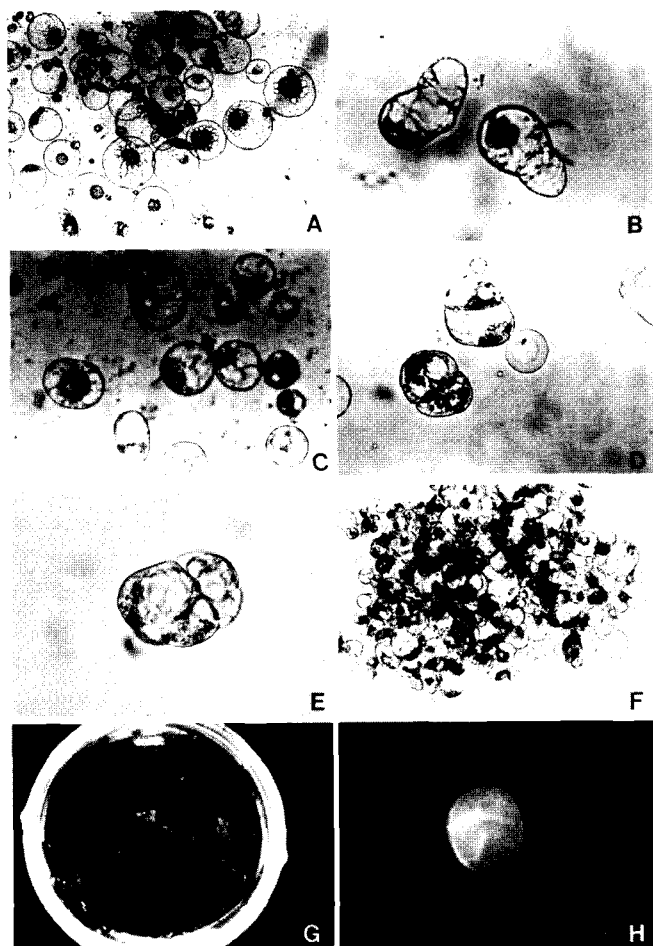


Figure 1. Light micrographs of cultured protoplast. A, Protoplasts isolated from callus cells, $\times 320$; B, Budding division after 3-4 days of culture, $\times 320$; C, Elongated protoplasts after 1 day of culture, $\times 320$; D, First cell division after 3-4 days of culture, $\times 320$; E, Secondary cell division after 5-6 days of culture, $\times 600$; F, Cell colony formed from protoplasts after 2 weeks of culture, $\times 100$; G, Minute microcalli formed from cell colony after 5 weeks of culture; H, Fluorescence micrograph of an elongated protoplast regenerating the cell wall after 1-2 days of culture, $\times 320$.

높은 농도인 2% 이상의 농도에서는 세포분열이 급격히 감소되었다 (Figure 2). 1% DMSO를 첨가한 배지에서 1일 동안 배양한 원형질체는 난형이나 길게 신장된 형태를 나타내었고 (Figure 1C) 첫 분열은 배양 3~4일 후에 (Figure 1D), 2차 분열은 배양 5~6일 후에 관찰되었다 (Figure 1E). 배양 약 2주 후에는 수많은 세포괴들이 관찰되었으며 (Figure 1F), 육안으로 관찰 가능한 microcalli는 배양 약 5주 후에 관찰되었다 (Figure 1G). 또한 1% DMSO를 첨가한 배지에서 1~2일 동안 배양된 난형 또는 신장된 형태의 원형질체를 0.1% cellufluor로 형광염색하였을 때 DMSO를 첨가하지 않은 배지에서 배양된 원형질체와는 달리 매우 밝은 형광을 나타내어 세포벽이 재생되었음을 알 수 있었다 (Figure 1H). 각 배지에서 3일 동안 배양된 원형질체의 세포활성을 비교한 결과 DMSO 첨가유무나 첨가된 DMSO의 농도와는 관계없이 대부분의 배지에서 약 83~88%의 활성을 나타내어 (Figure 3),

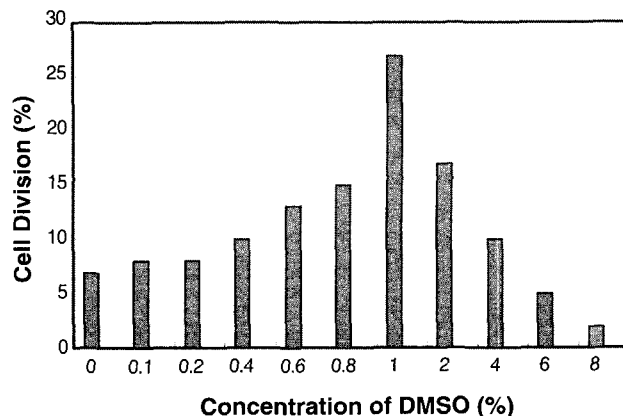


Figure 2. Cell division efficiency after 3-4 days culture of protoplasts in medium with various concentrations of DMSO.

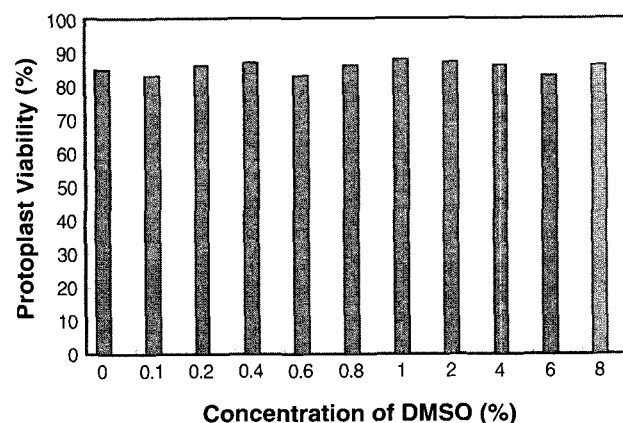


Figure 3. Protoplast viability after 3-4 days culture of protoplasts in medium with various concentrations of DMSO.

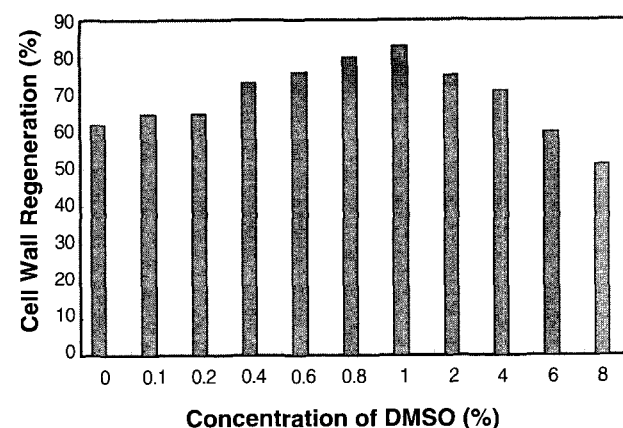


Figure 4. Cell wall regeneration after 3-4 days of cultured protoplast in medium with various concentrations of DMSO.

원형질체 배양시 DMSO는 세포활성에는 별로 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다. 한편 DMSO가 첨가되지 않은 배지와 DMSO가 첨가된 배지에서 3일 동안 배양된 원형질체의 세포벽 재생률을 비교한 결과, DMSO가 첨가되지 않은 배지보다 첨가된 배지의 세포벽 재생률이 전체적으로 높게 나타났다. 특히 DMSO가 첨가되지 않은 배지에서의 세포벽

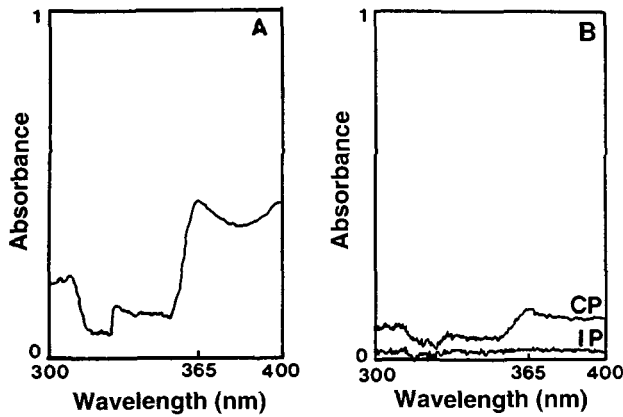


Figure 5. Comparison of fluorescing absorbance among callus, isolated and cultured protoplasts. A, Calli cells; B, Freshly isolated protoplasts (IP) and 3-day cultured protoplasts (CP) in medium with 1% DMSO.

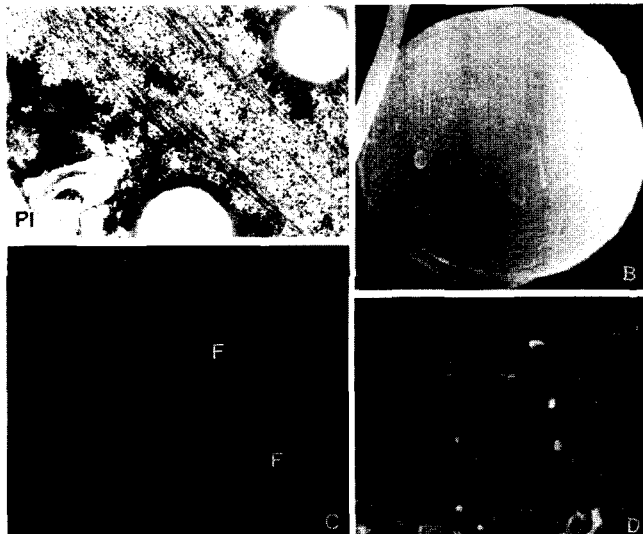


Figure 6. Transmission (A) and Scanning (B-D) electron micrographs of cultured protoplast. A, Microtubules (Mt) parallel to plasmalemma (PI), $\times 20,000$; B, An isolated protoplast shows the smooth surface of protoplast, $\times 3,000$; C, Protoplast after 1 day of culture. The surface of protoplast is covered with short fibrils (F), $\times 20,000$; D, Protoplast after 3-4 days of culture. The protoplast surface is covered with net-work formed fibrils, $\times 80,000$.

재생률이 약 62%인 반면, 1% DMSO가 첨가된 배지에서 재생률은 약 83%로 높게 나타났다 (Figure 4).

캘러스 세포와 분리 직후의 원형질체 및 각 배지에서 3일 동안 배양된 원형질체를 0.1% cellufluor로 형광염색하여 UV-spectrophotometer를 이용한 microfluorometry에 의하여 각각의 흡광도를 측정된 결과, 캘러스 세포는 cellufluor의 최대흡수파장인 365 nm에서 최대 peak를 나타낸 반면 (Figure 5A), 분리 직후의 원형질체에서는 거의 형광을 띄지 않아 365 nm에서 이러한 peak가 나타나지 않았다 (Figure 5B). 반면 1% DMSO가 첨가된 배지에서 3일 동안 배양된 원형질체에서는 캘러스 세포와 비교하였을 때 형광량의 정도

에는 다소 차이가 있었으나 캘러스 세포와 거의 유사한 형태의 흡광도를 나타내어 365 nm에서 peak가 나타났다 (Figure 5B).

원형질체 배양매지에 1% DMSO를 첨가하여 3일 동안 배양한 원형질체를 투과전자현미경으로 관찰하였을 때 미소관 (microtubule)이 원형질막 근처에 평행으로 배열되어 있는 것이 관찰되었다 (Figure 6A). 또한 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 분리 직후의 원형질체는 원형질막 표면에 아무 것도 형성되어 있지 않은 반면에 (Figure 6B) 배양 1일 후에는 가느다란 fibril들이 원형질막 표면에 형성되어 있었고 (Figure 6C) 배양시간이 경과할수록 점차 fibril의 양이 많아지면서 이웃한 fibril들과 연결되어 다발을 형성하는 것이 관찰되었다 (Figure 6D).

고 찰

인삼 캘러스 조직으로부터 분리한 원형질체를 DMSO가 첨가되지 않은 배지와 여러 가지 농도의 DMSO가 첨가된 배지에서 배양한 결과 1% DMSO가 첨가된 배지가 원형질체 배양에 매우 효과적이었다. 특히 배지에 첨가된 DMSO는 원형질체의 세포벽 재생 효율과 세포분열 빈도를 높이는 것으로 나타났다. DMSO가 첨가되지 않은 배지에서 배양된 원형질체의 세포벽 재생은 약 62%였으며, 세포분열 빈도는 약 7%로 매우 낮았다. 반면에 1% DMSO가 첨가된 배지에서 배양된 원형질체의 세포벽 재생은 약 83%이었고 세포분열 빈도도 약 27%로 높게 나타났다. 이러한 결과는 인삼 캘러스 원형질체를 배양할 때 배지에 첨가된 1% DMSO가 세포벽 재생된 원형질체의 세포분열을 촉진시키는 것으로 생각된다. 한편 배지에 첨가된 DMSO의 유무나 농도와는 상관없이 거의 모든 배지에서 배양된 원형질체의 세포활성은 약 83~88%로 큰 차이는 보여주지 않았다. 이것은 DMSO가 원형질체 배양시 세포활성에는 별로 영향을 끼치지 않았음을 나타내고 있다. 각 배지에서 3일 동안 배양된 원형질체를 0.1% cellufluor로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였을 때 형광의 정도에는 차이가 나타났다. 특히 DMSO가 첨가되지 않은 배지에서보다 1% DMSO가 첨가된 배지에서 배양된 원형질체는 높은 흡광도를 나타내었다 (data not shown). 이러한 결과는 배지에 첨가된 DMSO가 원형질체의 세포벽 재생에 긍정적인 효과를 나타낸 것으로 생각되며, 이는 원형질체 분리 과정 중 무질서하게 배열된 미소관들이 DMSO에 의해 정상적으로 재배열되었기 때문에 세포벽 형성을 촉진시킨 것으로 사료된다 (Marchant 1979; Lloyd et al. 1979; Robinson and Engelborghs 1982). 이러한 사실은 배양된 원형질체에서 재생된 세포벽의 형광량과 β -linkage group을 갖는 세포벽 물질량과 비례한다는 연구 보고를 지지하여 주고 있다 (Galbraith 1981). DMSO가 첨가되지 않은 배지에서 배양된

원형질체의 세포벽 재생은 양호하였으나 세포분열 빈도는 매우 낮은 반면, 1% DMSO가 첨가된 배지에서 배양된 원형질체에서는 세포벽 재생과 세포분열 빈도가 모두 높은 것으로 미루어 보아, DMSO를 처리하지 않은 배지에서 재생된 세포벽은 지속적인 분열을 일으키지 못하는 세포벽양체 (pseudo-wall)인 것으로 보여진다 (Meyer and Abel 1975). 이는 원형질체의 세포벽 재생과 세포분열과의 관계에 있어 세포벽 재생이 세포분열의 선행 필수 조건이라는 연구보고 (Schilde-Rentschler 1977)와 유사한 결과이다.

1% DMSO가 첨가된 배지에서 배양된 원형질체를 투과전자현미경으로 관찰하였을 때 미소관들이 원형질막 근처에 평행으로 배열되어 있는 것이 관찰되었는데, 미소관의 방향성은 새로이 형성될 세포벽의 microfibril의 방향성과 일치하는 것으로 보고되었다 (Palevitz and Hepler 1976; Palevitz 1981). 미소관과 세포벽 재생과의 관계는 여러 연구자들에 의해 보고되었는데 (Marchant 1979; Marchant and Hines 1979; Lloyd et al. 1979), 이들은 DMSO에 의해 미소관편제센타 (microtubule organizing center, MTOC)의 재형성이 유도되고, 이들 MTOC로부터 self-assembly된 미소관들이 세포벽 구성물질인 cellulose microfibrils의 침적과 배열에 직접적으로 관여한다고 주장하였다.

주사전자현미경으로 관찰된 배양된 원형질체의 표면에 형성된 microfibril이 정상적인 세포벽 성분인 cellulose로 구성되어 있는지를 조사한 결과, 켈러스 세포와 비교하여 형광량의 정도에는 다소 차이가 있으나 거의 유사한 peak를 나타내어 정상 세포의 세포벽과 같은 성분으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 배양된 담배 엽육원형질체의 표면에서 형성된 fibril이 cellulose성분으로 되어 있음이 보고 (Nagata and Yamaki 1973)된 이후, 당근 배양세포의 원형질체를 배양하였을 때 초기에는 원형질체 표면에 짧은 polymer를 형성하다가 점차 배양기간이 길어짐에 따라 정상적인 길이의 cellulose chain이 형성되었음이 보고되었다 (Asamizu et al. 1977). 담배 엽육원형질체를 배양하였을 때나 (Herth and Meyer 1977), 또는 콩의 현탁배양세포 원형질체를 배양하였을 때 (Klein and Delmer 1979), 원형질체의 표면에 형성된 fibril이 cellulose로 구성되어 있음을 보고한 연구가 많이 있어 본 실험결과를 지지하여 주고 있다.

적 요

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 켈러스 조직으로부터 분리한 원형질체를 DMSO가 0%에서 8%까지 여러 가지 농도로 첨가된 원형질체 배양배지 (1 mg/L 2,4-D, 4 mg/L NAA, 1 mg/L BAP, 0.4 M mannitol 및 0.8% agar가 첨가된 MS배지)에서 배양하였다. DMSO가 첨가되지 않은 배지에서 배양된 원형질체의 세포벽 재생률은 약 62%이고 세포분열빈

도는 약 7%이었다. 반면에, 1% DMSO가 첨가된 배지에서 배양된 원형질체의 세포벽 재생률과 세포분열빈도는 각각 약 83%와 약 27%로 높게 나타났다. 그러나 배양된 원형질체의 세포활성은 배지에 첨가된 DMSO의 유무나 농도와는 관계 없이 모든 배지에서 83~88%로 차이를 보이지 않았다. 1% DMSO가 첨가된 배지에서 3일 동안 배양된 원형질체를 투과전자현미경으로 관찰하면 원형질막 근처에 평행으로 배열하고 있는 미소관들이 관찰되었다. 또한 원형질막 표면에는 세포벽 성분인 cellulose fibril들이 연결되어 다발을 형성하고 있는 것이 주사전자현미경으로 관찰되었다. DMSO가 첨가되지 않은 배지에서 배양된 원형질체에서는 이러한 전자현미경적 구조들이 관찰되지 않았다. 원형질체 배양배지에 첨가된 DMSO는 미소관편제센타 (MTOC)의 형성에 의하여 세포벽 재생과 세포분열을 유도하는 것으로 생각된다.

사사 - 본 연구는 1999년도 신라대학교 연구비로 이루어졌음.

인용문헌

- Asamizu T, Tanaka K, Takebe I, Nishi A (1977) Change in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall on carrot protoplasts. *Physiol Plant* **40**:215-218
- David H, David A, Mateille T (1982) Evaluation of parameters affecting the yield, viability and cell division of *Pinus pinaster* protoplasts. *Physiol Plant* **56**:108-113.
- Evans DA, Bravo JE (1983) Plant protoplast isolation and culture. *Int Rev Cytology Supplement* **16**:33-53
- Galbraith DW (1981) Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using calcofluor white. *Physiol Plant* **53**:111-116.
- Hahne G, Hoffmann F (1984) Dimethylsulfoxide can initiate cell divisions of arrested callus protoplasts by promoting cortical microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:5449-5453.
- Herth W, Meyer Y. (1977) Ultrastructural and chemical analysis of the wall fibrils synthesized by tobacco mesophyll protoplasts. *Biol Cellulaire* **30**:33-40
- Himes RH, Burton PR, Gaito JM (1977) Dimethylsulfoxide self assembly of tubulin lacking associated proteins. *J Biol Chem* **252**:6222-6228.
- Horine RK, Ruesink JP (1972) Cell wall regeneration around protoplasts isolated from *Convolvulus* tissue culture. *Plant Physiol* **50**:438-445
- Klein AS, Delmer DP (1979) Characterization of the regenerating wall of soybean protoplasts. *Plant Physiol (suppl.)* **63**:51
- Lloyd CW, Slabas AR, Powell AJ, MacDonald G, Badley RA (1979) Cytoplasmic microtubules of higher plant cells visualized with antitubulin antibodies. *Nature* **279**:239-241
- Marchant HJ (1979) Microtubules, cell wall deposition and the

- determination of plant cell shape. *Nature* **278**:167-168
- Marchant HJ, Hines ER** (1979) The role of microtubules and cell wall deposition in elongation of regenerating protoplasts of *Mougeotia*. *Planta* **146**:41-48
- Meyer Y, Abel WU** (1975) Importance of the wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco protoplasts. *Planta* **123**:33-40.
- Nagata T, Yamaki T** (1973) Electron microscopy of isolated tobacco mesophyll protoplasts cultured in vitro. *Z Pflanzenphysiol* **70**:452-459.
- Palevitz BA** (1981) Microtubules and possible microtubule nucleation centers in the cortex of stomatal cells as visualized by high voltage electron microscopy. *Protoplasma* 107-115-125.
- Palevitz BA, Hepler PK** (1976) Cellulose microfibril orientation and cell shaping in developing guard cells of *Allium*-role of microtubules and ion accumulation. *Planta* **132**:71-93
- Robenek H, Peveling E** (1977) Ultrastructure of the cell wall regeneration of isolated protoplasts of *Skimmia japonica* Thunb. *Planta* **136**:135-145
- Robinson J, Engelborghs Y** (1982) Tubulin polymerization in dimethylsulfoxide. *J Biol Chem* **257**:5367-5371
- Robinson DG, Kristen U** (1982) Membrane flow via the golgi apparatus of higher plant cells. *Int Rev Cytol* **77**:89-127.
- Rose RJ** (1980) Factors that influence the yield, stability in culture and cell wall regeneration of spinach mesophyll protoplasts *Aust J Plant Physiol* **7**:713-725
- Schilde-Rentschler L** (1977) Role of the cell wall in the ability of tobacco protoplasts to form callus. *Planta* **135**:177-181

(접수일자 2000년 9월 7일)