

세포벽을 통한 유전물질 전이와 체세포 잡종의 재생*

유장걸**, 소인섭***, 홍경애****

Transfer of Plant Genetic Substance Through Cell Wall and Regeneration of Somatic Cell Hybrid*

Zang-Kual U. **, In-Sup So***, Kyung-Ae Hong****

Summary

The enzymatically isolated protoplasts generally give difficulties in cell differentiation and regeneration because the enzymes used could alter the physiological properties of protoplasts. In this study, the possibility that DNA could move out of the cell isolated from radish hypocotyl callus was investigated after treatments with low pH, high concentration K⁺, GA₃ combined with centrifugal force, all of which are known to affect the physico-chemical properties of cells.

1. Treatment with 1.0% NaOCl for 20 min. by infiltration was found to be effective for the surface sterilization of radish seeds and the improvement of germination rate.
2. MS medium containing BA 0.5ppm and 2,4-D 1.0ppm gave the best callus formation from the radish hypocotyls.
3. The working concentration of SDS as an anion detergent which minimize the cell deterioration and function was 1ppm.
4. High K⁺ concentrations (0.1% to 2.0%) and low pH (pH 4 to 5) treatments resulted in the movement of DNA out of the radish hypocotyl callus cells.
5. The GA treatment was less effective than that of K⁺, but the DNA band appeared in the gel electrophoresis.

* 본 논문은 1990년도 교육부 학술연구 조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

** 농과대학 농화학과(Dept. of Agricultural Chemistry, Cheju Univ., Cheju-do, 690-756, Korea)

*** 농과대학 원예학과

**** 대학원 농화학과(박사과정)

서 론

식물세포의 형질변이를 유기시키기 위한 시도는 새로운 품종을 육성한다는 목적 이외에도 유전인자의 전이 및 발현에 관한 기초 연구를 위해서 많은 연구자들의 관심의 대상이 되어 왔다(Walden *et al.* 1990, Masterson *et al.* 1989, Weising *et al.* 1988).

1960년 Cocking에 의해서 세포벽을 효소처리하는 기술이 개발됨과 더불어 원형질체 분리 및 세포 융합에 대한 연구가 가속화 되었고 융합율을 높이기 위해서 화학물질 처리 즉 NaNO_3 (Power *et al.* 1970), 높은 pH에서의 calcium(Keller and Melchers, 1973), PEG(Kao and Michayluk, 1974)의 처리가 시도되었고 Zimmermann 등(1981)은 전기자극법에 의한 원형질체 융합법을 개발하였다.

그러나 효소처리에 의해서 분리된 원형질체는 효소 처리에 따른 생명활성의 감소가 문제로 대두되어 왔다. 즉 intact 상태의 원형질체와 효소처리로 분리된 원형질체는 여러면에서 그 특성이 다르다는 사실도 잘 알려지게 되었는데(Cassels *et al.* 1982; Kasier *et al.* 1983) 이것은 원형질막이 효소 처리시에 손상을 당하게 되어 막활성 내지는 막특성이 변화되므로써 세포의 분열과 재분화에 나쁜 영향을 주기 때문이다(Ahuja, 1982). 그러므로 원형질체의 vitality 또는 viability를 좋게 유지시키는 것은 대단히 중요하다. 이를 증진하기 위해서는 vital staining법, cytoplasmic streaming법(Kamiya, 1973), plasmolysis법(Collander, 1973), fluorescein diacetate 법을 이용하는데 그 외에도 원형질체막의 요소 투과성을 이용하는 방법(Palta *et al.* 1978)도 있다.

원형질체의 활성이 좋다고 해도 융합이 이루어진 뒤에 목적하는 식물체를 만드는 데는 많은 어려움이 뒤 따르게 된다. 따라서 세포벽을 제거하지 않은 상태에서 유전물질의 삽입내지는 세포융합의 시도가 요구되며 Wu Boji 등(1988)은 원심분리법으로 담배(*N. tabacum*)와 시금치(*S. oleracea*)의 hybrida를 만들었다고 보고한 바 있다. 그러나 원심분리법에 관한 자세한 내용이 밝혀져 있지 않기 때문에 본 연구에서는

원심분리법에 접근하기 위한 각 단계의 조건을 확립하기 위한 일환으로 callus에서 분리된 세포의 막구조에 영향을 미치는 낮은 pH, 고농도의 K^+ , GA_3 및 원심력을 처리해서 유전물질인 DNA가 세포 밖에서 검출될 수 있는지를 검토해 보았다. 즉 이는 한종의 세포와 다른 종의 세포를 혼합시켜 callus 배양을 한 뒤 상기 처리에 의해서 유전물질의 세포간 이동 가능성을 검토하는 일차적 단계에 그 뜻이 있다고 하겠다.

재료 및 방법

1. 유묘배양

Callus를 유기시키기 위한 체세포 조직을 얻기 위해서 무우(*Raphanus sativus* L., 백호, 서울교배), 배추(*Brassica rapa* L., 내서 백로, 서울교배) 그리고 당근(*Daucus carota* L., 하과5촌, 서울교배) 종자를 구입하고 표면 살균을 위한 초저 조건을 찾기 위해서 NaOCl 을 3수준(0.5%, 1%, 1.5%)으로 하고 진공 처리 및 무처리를 조합시켜 20분간 침지 살균한 뒤 증류수로 세번 세척하고 10ml의 MS 배지가 담긴 $15 \times 200\text{mm}$ 의 시험관에 파종하여 온도 25°C, 광도 2000lux의 배양실에서 발아 생육시키고 오염정도와 발아율을 조사했다.

2. Callus 유기

식물체 부위에 따른 callus 유기 효과를 알아보기 위해서 유묘를 hypocotyl, epicotyl 및 cotyledon의 3부분으로 나누어 10mm 길이로 잘라 MS 배지상에서 배양했는데 성장조절 물질로 2,4-D를 0ppm, 0.25ppm, 0.5ppm, 1.0ppm, 2.0ppm의 5수준 그리고 BA는 0ppm, 0.25ppm, 0.5ppm, 1.0ppm의 4수준을 조합한 20개 처리에 대하여 callus 유기 상태를 비교 검토하였다.

3. Callus로 부터 단세포 분리

100ml 삼각플라스크 내에서 4주간 생장시킨 callus를 꺼낸 뒤 유리막대를 이용하여 작은 조각으로 만들고 이것을 0.3M-sorbitol washing solution(WS)(Table 1) 2.0ml가 들어있는 10ml 시험관으로 옮겨 vortex mixer로 부드럽게 천탕시킨 후에 50 μm nylon sieve로 찌꺼기를 걸러냈다. 이 여액을 100xg에서 1

Table 1. Washing solutions (WS) of cells

Salts used	Concentration (mg/l)
KH ₂ PO ₄	22.7
KNO ₃	101.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1480.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246.0
KI	0.16
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
Sorbitol WS : 0.3M sorbitol solution containing the above salt mixture	
Sucrose WS : 0.3M sucrose solution containing the above salt mixture pH 5.8 in both cases	

분간 원심분리하여 깨진 세포조각들을 제거한 뒤 pellet에 0.3 M-sucrose WS 2ml를 가하여 부드럽게 현탁시킨 뒤 1000xg에서 30초간 원심분리하여 불순물을 제거하였는데 이 조작을 4번 반복하여 callus를 단세포화 시켰다.

Callus로 부터 세포를 분리한 이후의 모든 실험은 무우의 hypocotyl로 부터 유기된 callus에서 얻어진 세포를 이용하여 수행되었다.

4. 유전물질의 세포 외부로의 이동 검증을 위한 DNA 분석

세포와 세포 사이로 유전물질이 전이된다는 것은 어떤 경로이든 한세포로 부터 일단 유전물질이 밖으로 나온다는 뜻인데 세포간의 전이를 관찰한다는 것은 어려울 뿐만 아니라 장시간이 소요되기 때문에 몇 가지 처리에 의하여 DNA가 세포밖으로 유출되는지를 알아 보기 위해서 세포를 가능한 파괴시키지 않는 조건에서 DNA를 검출하기 위해서 다음과 같은 조작을 수행하였다.

1) DNA 분리 조작

식물체로 부터의 DNA 분리 및 분석에 대해서는 많은 연구가 이루어졌는데 본 실험에서는 Scott 등 (1988)과 Davis 등 (1986)의 방법을 응용하였다.

Callus로 부터 각각의 세포를 떼어 단세포화 시킨 시료를 1g 취하여 4-3) 및 5-1), 2), 3) 처리를 한 뒤

에 원심분리관에 넣고 현탁시킨 후 3000xg에서 원심분리하여 상정액을 버리고 여기에 TE buffer 1ml와 1ppm SDS 125μl를 가하여 현탁시킨 후 3000xg에서 다시 원심분리하였다.

상정액을 시험관에 취하여 최종 농도가 0.3M이 되게 3M sodium acetate를 가하여 얼음위에서 30분간 방치한 뒤 3000xg에서 10분간 원심분리하였다. 상정액을 새로운 시험관에 옮기고 이와 동일한 부피의 phenol과 chloroform을 각각 가하여 vortex mixer로 진탕하여 원심분리했다.

상정액을 다른 원심분리관에 옮기고 이와 동일한 부피의 chloroform을 가하여 부드럽게 혼든 다음 원심분리했다. chloroform층을 제거하고 남은액에 이액의 2.5배 부피의 무수 알콜을 가하여 시료와 잘 섞이게 한 다음 -20°C에서 1시간 방치한 후 원심분리하여 DNA 침전을 얻었다.

알콜을 제거한 후 DNA 순도를 높이기 위해서 75% 알콜 2ml를 다시 가하여 3000xg에서 20분간 원심분리하여 시료의 손실이 없도록 조심하면서 알콜을 제거한 후 진공 desiccator에서 알콜이 완전히 마를때 까지 건조시켰다.

(2) 전기영동

Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer에 agarose를 가해서 water bath 상에서 가열 용해시켜 0.8%가 되도록 한 후 약 70°C 이하로 된 뒤 ethidium bromide (10mg/ml)를 가하여 최종농도가 0.5μg/ml 되도록 하여 gel maker (Mupid-2, Cosmo Bio Co., Ltd.)에 부어 agarose gel판을 만들었다. 건조된 DNA에 TE buffer 15μl와 염료 혼합액 (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene xylene 15% Ficoll 400) 3μl를 혼합시킨 뒤 agarose gel 판의 well에 주입하여 50V에서 1시간 동안 전개시키고 UV-illuminator (chromato-VUE, model C-70G, San Gabriel, CA 91778 U.S.A.)로 DNA band를 관찰했고 이를 Asahi-Pentax MX로 흑백필름을 이용하여 촬영하였다.

(3) 세포막에 영향을 주는 SDS 적정 농도 처리

SDS는 음전하 세척제 (negative detergent)로서 식물세포중의 DNA를 분리할 때 세포를 마쇄시킨 뒤 세포에서 유출된 DNA가 마쇄된 세포조각들에 의해

흡착되어 있는 것을 떼어내기 위하여 보통 100000ppm의 SDS(최종농도로는 10000ppm)가 필수적으로 사용되는데 본 실험의 경우에는 세포를 파괴시키는 것이 목적이 아니기 때문에 SDS의 사용 농도를 잘 조절해줄 필요가 있다.

즉 SDS의 적정 농도를 설정하기 위하여 시료에 최종농도로서 1000ppm, 100ppm, 10ppm, 그리고 1ppm이 되도록 각각 처리한 뒤에 FDA staining법으로 세포의 viability를 측정하고 4-1) 방법으로 DNA를 분석함으로써 세포막에 손상을 주지 않고 detergent로서의 역할도 수행할 수 있는 SDS의 적정 농도를 검토하였다.

5. 유전물질 이동 촉진 처리

1) pH 및 K⁺ 이온 처리

MS 배지에서 KNO₃를 달린(KNO₃ 0.1%, 0.5%, 1% 그리고 2%) 배지를 pH 2, pH 3, pH 4 그리고 pH 5.0로 각각 조절하고 이 용액 5ml에 분리된 세포를 현탁시키고 시간의 경과에 따른 세포의 viability를 측정했다.

또 이상과 같이 pH 및 K⁺ 처리를 했을때 세포벽 밖으로 유전물질이 나올 수 있는지를 알아보기 위해서 상기 현탁액에 대해 4-1)의 방법으로 DNA 분석을 수행하였다.

2) 원심분리 조건 확립

세포를 pH 4의 K⁺이온 처리 용액 5ml 또는 GA 처리 용액 5ml에 1시간 침적한 후 원심분리를 하지 않은 대조구와 4000xg 그리고 7500xg에서 원심분리하고 4-1)의 방법으로 DNA를 분리, 측정함으로써 원심분리 효과 유무를 검증하였다.

3) GA₃ 농도

1×10⁻⁴M, 1×10⁻⁵M, 1×10⁻⁶M 그리고 1×10⁻⁷M의 GA를 포함하는 MS 용액을 pH 4와 pH 5.0로 조절한 후 여기에 세포를 1시간 처리한 뒤 GA의 효과를 알아보기 위해서 4-1)의 방법으로 DNA 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 발아 및 유도배양

Callus를 유기시키기 위한 무우, 배추 및 당근 종자를 infiltration 처리 했을때와 안했을때 서로 다른 농도의 NaOCl로 표면 살균하여 발아시킨 결과는 Table 2와 같다.

발아율의 증가가 정지되는 시기를 기준으로 한 발아속도는 무우가 1주일, 배추는 2주일, 당근은 3주일로 식물에 따라 상이하였고 NaOCl 1.0%를

Table 2. Effect of the surface sterilization treatments on germination rate of cabbage, radish and carrot seeds

Treatments	Germination rate (%)					
	Radish 1st week	Cabbage 1st week 2nd week		Carrot 1st week 2nd week 3rd week		
Control	60	30	60	0	20	60
NaOCl 0.5%	50	30	50	0	20	50
NaOCl 0.5%+ Infiltration	70	50	85	0	30	70
NaOCl 1.0%	80	40	85	0	30	80
NaOCl 1.0%+ Infiltration	85	50	90	0	50	90
NaOCl 1.5%	55	40	80	0	30	70
NaOCl 1.5%+ Infiltration	60	40	80	0	40	80

infiltration하여 처리하였을때 무우, 배추, 당근 모두에서 가장 높은 발아율을 보였다. 한편 오염율은 각 처리와 관계없이 아주 작게(약 10%) 관찰되었으므로 NaOCl은 표면 살균제로의 기능보다 발아율 상승에 더욱 효과적이었다고 생각되며 infiltration에 의해서 그 효과가 한층 증진되었음을 알 수 있었다.

시험관(15×200mm)내 배양의 경우 유도 성장속도는 발아가 빨리던 무우가 제일 빨랐고 그 다음에 배추 그리고 당근은 현저하게 느린 성장을 보였다.

2. Callus 유기 조건 확립

Callus 형성이 양호한 배지조건을 확립하기 위해서 BA와 2,4-D를 농도별로 조합하여 처리했던 결과 BA 0.5ppm과 2,4-D 1.0ppm을 혼합 처리했을때 callus 유기가 제일 좋았는데 이는 무우, 배추, 당근에서 모두 동일한 경향이었다.

또한 식물체 부위별(epicotyl, hypocotyl, cotyledon) 결과를 보면 역시 BA 0.5ppm, 2,4-D 1.0ppm을 첨가시킨 MS 배지에서 hypocotyl이 무우, 배추, 당근에서 모두 가장 좋은 callus 형성을 보였는데 Table 3에서는 무우의 경우만을 나타냈다.

Table 3. Effect of BA and 2,4-D concentration combination on callus formation of three different parts(cotyledon, epicotyl and hypocotyl) of radish

2,4-D (ppm)	BA (ppm)														
	0			0.1			0.25			0.5			1.0		
	Plant parts ^z														
	C	E	H	C	E	H	C	E	H	C	E	H	C	E	H
0	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	++
0.25	+	+	++	+	++	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	+++
0.5	+	+	++	+	++	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	+++
1.0	+	+	++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++
2.0	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++

^zC : Cotyledon E : Epicotyl H : Hypocotyl
 Symbols : + : bad
 ++ : medium
 +++ : good
 +++++ : excellent

3. Callus로 부터 세포의 분리

Callus로 부터 단세포를 분리하기 위해서 유리막대로 부드럽게 작은 조각을 만들고 50μm nylon sieve로 여과한 뒤 0.3M-sucrose 용액을 이용하여 3~4회 1000xg에서 원심분리하게 되면 비교적 순수분리된 단세포를 얻을 수 있었다(Fig.1). Fig.2는 viability가 양호할 때의 세포를, 그리고 Fig.3은 시간이 많이 경과되었거나 낮은 pH 또는 고농도의 K⁺ 처리로 인하여 세포의 viability가 나빠졌을때의 세포를 FDA staining법으로 염색한 결과이다.

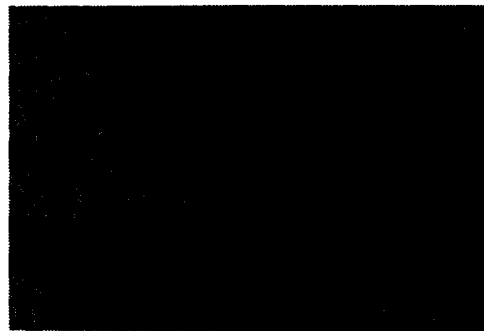


Fig.1. Single cells isolated from the callus of radish hypocotyl.

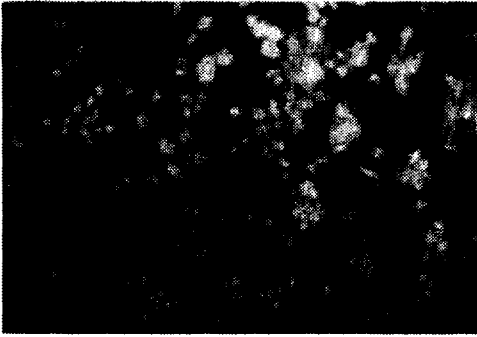


Fig. 2. Single cells with good viability, observed by the FDA staining method.



Fig. 3. Single cells with bad viability, observed by the FDA staining method.

4. 유전물질 이동 촉진 처리 효과

Wu Boji 등(1988)이 시도했던 바와 같이 낮은 pH, 고농도의 K⁺ 이온 및 원심력 처리에 의한 유전물질의 이동성 여부를 관찰했다.

이상의 처리를 한 뒤 DNA를 분리하여 전기영동상에서 관찰한 DNA는 분자량 크기별로 볼때 3가지로 구분할 수 있는데 50V에서 한시간 전기영동했음에도 well에서 전혀 움직이지 않는 것과 maker로 사용된 λEcoRI에서 제일 분자량이 큰 19.33kb에 가까운 크기의 DNA 그리고 그 이하의 불연속적 크기로 이루어진 집단들이었다.

이같은 집단들이 DNA 분리 조작중에 shearing된 것인지 또는 전기영동시 trailing이나 smearing에 의한 것인지는 불분명하였다.

1) SDS의 영향

TE buffer로 세포를 현탁시킨 용액에 SDS 용액을

가해서 SDS의 최종농도가 1000ppm, 100ppm, 10ppm, 1ppm이 되도록 처리한 세포의 viability를 관찰한 결과 최종농도가 1000ppm되는 처리구에서는 생존된 세포가 55%이었으며 SDS의 농도가 낮을수록 세포의 viability가 높았다(Fig. 4).

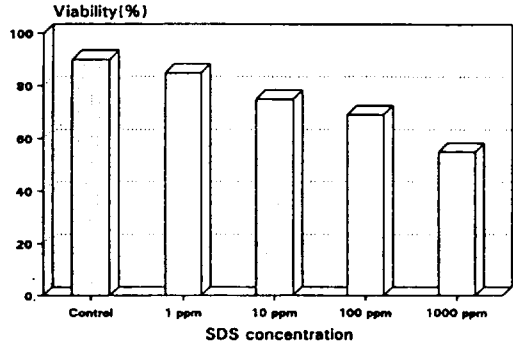


Fig. 4. Cell viability influenced by the treatments of different SDS levels.

1 2 3 4 5 6 7



Fig. 5. Effect of SDS concentrations on cell disruption, shown by DNA observation.

1. SDS 1000ppm
2. SDS 100ppm
3. SDS 10ppm
4. SDS 1ppm
5. Ground cell+SDS 1ppm
6. Ground cell+no SDS
7. Marker

1ppm 처리구는 viability가 85%로써 control 구의 90%와 근소한 차이만을 보여 viability에 별다른 영향이 없었던 것으로 생각된다.

이상과 같이 SDS 농도를 달리하여 처리했을때 어느 정도 세포막 구조를 변형시키고 이에 따라 DNA가 유출되는지의 여부를 실험한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 1ppm을 제외한 그 이상의 농도에서는 DNA band가 관찰되었다. 따라서 SDS 처리가 세포막을 파괴하지 않고 세포막 표면에 detergent로의 작용을 할 수 있는 농도는 1ppm이라고 생각된다.

2) pH 및 K⁺ 이온 처리

MS 배지용 pH 2, pH 3, pH 4와 pH 5.0으로 각각 조절하고 여기에 세포를 침적 처리하여 시간의 경과에 따른 viability 변화를 FDA 방법으로 관찰한 결과 pH 3 이하에서는 침적후 1시간 이내에 대부분의 세포가 형광을 발하지 않아 세포가 모두 죽었음을 알 수 있었다. 즉 pH 3 이하에서는 산도가 너무 높아 어떠한 효과도 기대할 수 없다고 생각되며 따라서 pH 4 이상에서 K⁺ 및 GA₃ 처리 실험을 수행했다. 그러나 이같은 사실은 Wu Boji 등(1988)이 시금치의 callus 세포를 pH 2로 1시간 동안 처리할 수 있었다는 결과와는 일치하지 않고 있다.

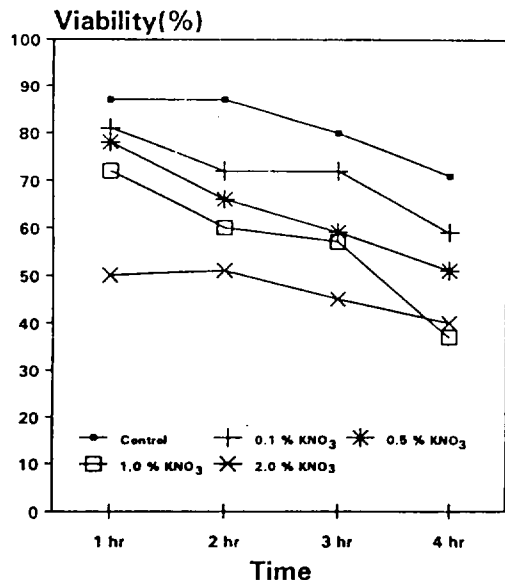


Fig. 6. Change of cell viability by the KNO₃ treatment at pH 4.0 with time.

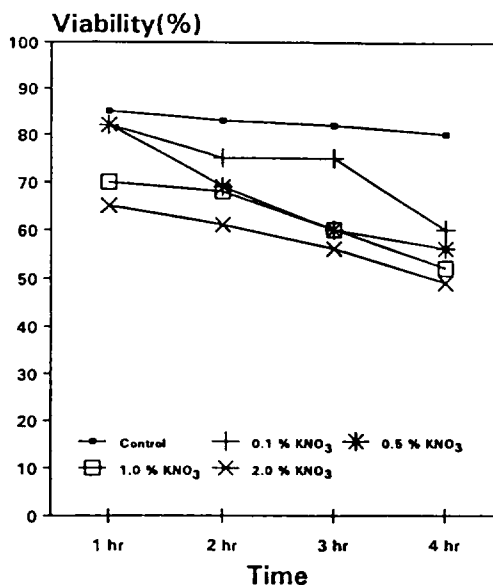


Fig. 7. Change of cell viability by the KNO₃ treatment at pH 5.8 with time.

Fig. 6과 7에서 보는 바와 같이 세포의 viability는 pH 4와 pH 5.8에서 KNO₃ 농도를 달리 처리하였을 때 pH 5.8인 경우에 비해 pH 4에서 KNO₃ 농도와 관계없이 모두 낮아졌다. KNO₃ 농도가 높고 시간이 지나갈수록 pH 4와 pH 5.8에서 모두 viability가 감소됨을 알 수 있었다. 한편 DNA 분석 결과(Fig. 8과 9)

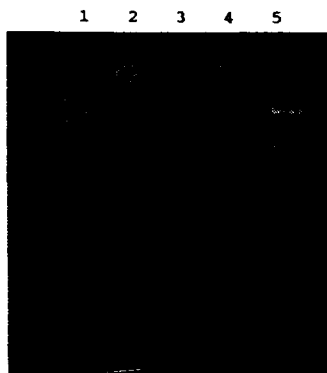


Fig. 8. DNA observation and the treatments of high concentration K⁺ at pH 4.0.

1. K⁺ 0.1% at pH 4.0
2. K⁺ 0.5% at pH 4.0
3. K⁺ 1.0% at pH 4.0
4. K⁺ 2.0% at pH 4.0
5. Marker

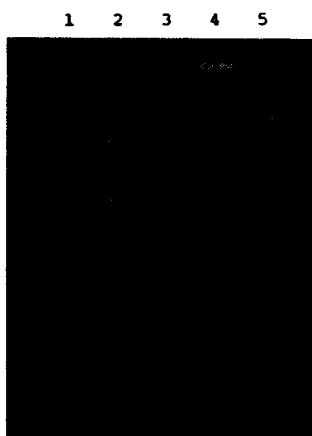


Fig. 9. DNA observation and the treatments of high concentration K⁺ at pH 5.0.

1. K⁺ 0.1% at pH 5.0
2. K⁺ 0.5% at pH 5.0
3. K⁺ 1.0% at pH 5.0
4. K⁺ 2.0% at pH 5.0
5. Marker

는 K⁺ 농도가 1%, 2%일 때에 agarose gel plate의 well내에 DNA가 많이 모여있는 것으로 보아 분자량이 큰 DNA라고 생각되며 KNO₃ 농도가 0.1%, 0.5%에서는 약 19kb DNA가 검출됨을 알 수 있었다.

3) 원심분리 조건 확립

K⁺ 이온과 GA₃ 용액에 처리된 세포를 원심분리하지 않고 여과만을 하여 DNA 분석을 한 경우에는 DNA가 검출되지 않았으나 3000xg에서 원심분리했을 때에는 DNA가 관찰되었다. 3000~7500xg에서 원심분리 한 후 세포의 viability는 대조구와 비교해서 별다른 차이없이 양호하였으나 7500xg 이상에서 원심분리하였을 경우는 현미경 검경 결과 세포의 대부분이 손상받는 것을 알 수 있었다.

즉 pH, K⁺, GA₃ 처리 후 3000xg 정도의 원심력 처리가 유전물질 이동에 유효하리라고 생각되며 Wu Boji 등(1988)은 3000~6000xg에서 chromatin DNA를 이동시켰다고 보고한 바 있다.

4) GA₃ 효과

4 수준의 GA₃ 농도를 갖는 pH 4의 배지 용액에 세포를 1시간 침적 처리한 뒤 DNA 분석을 한 결과는 Fig. 10에서 보는 바와 같다. 비록 소량이긴 하지만



Fig. 10. DNA observation and the treatments of different concentration GA₃ at pH 4.0.

1. GA₃ 1×10⁻⁷ at pH 4.0
2. GA₃ 1×10⁻⁶ at pH 4.0
3. GA₃ 1×10⁻⁵ at pH 4.0
4. GA₃ 1×10⁻⁴ at pH 4.0
5. Marker

분자량이 작은 DNA가 관찰되었는데 이것이 GA₃ 처리 효과로 유출된 DNA라고 단정하기는 아직도 검토되어야 할 부분이 많기는 하지만 GA₃ 처리가 세포벽이나 세포막의 연화에 작용한다는 보고(Taiz *et. al.* 1976)와 연관시켜 보면 원심력과 협동으로 유전물질 이전에 관여할 가능성이 있다고 생각되어진다.

적 요

효소처리에 의해 분리된 원형질체(protooplasts)는, 식물종에 따라 정도의 차이는 있지만, 원형질체의 생명 활성도가 intact cell에 비해서 많이 나빠지는 경우가 많은데 이는 원형질체의 나출시 사용된 효소에 의해서 세포막이 손상되었기 때문이라고 알려져 있다. 따라서 protoplast fusion 기법을 통해 세포의 분화 및 재생을 시도할 경우 많은 문제점이 제기될 수 있다. 본 연구에서는 무우의 hypocotyl callus를 얻은 뒤 이를 단세포화시키고 여기에 낮은 pH, 고농도의 K⁺ 그리고 GA₃를 작용시킨 다음 원심력을 처리하여 DNA가 세포 밖으로 나올 수 있는지의 가능성을 검토했다.

1. 종자를 진공 처리하여서 1.0% NaOCl 용액에 20분간 침지했을때 발아율이 제일 높았고 표면 살균도 효과적이었다.
2. 무, 벼, 당근의 hypocotyl, epicotyl, cotyledon으로 callus를 유기시킬때 BA 0.5ppm과 2,4-D 1.0ppm을 함유하는 MS 배지가 가장 효과적이었으며 식물 부위별로는 hypocotyl이 제일 양호한 callus를 형성시켰다.
3. 세포활성도 악화를 최소한으로 하면서도 음이

온 세척제로의 기능을 갖어 DNA 분리에 사용될 수 있는 SDS 농도는 1ppm이었다.

4. 무의 hypocotyl에서 유기된 callus로부터 분리한 세포에 고농도의 K⁺(0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%)를 pH 4.0과 pH 5.0에서 처리하고 3000xg 이상에서 원심력을 가했을 때 DNA가 세포 밖으로 이동된 것으로 관찰되었다.

5. GA₃ 처리는 K⁺ 보다 훨씬 정도가 약하지만 DNA band가 전기영동상에 나타났다.

참 고 문 헌

- Ahuja, M., 1982. Isolation, culture and fusion of protoplasts: problems and prospects, *Silvas Genet.* 31: 66-77.
- Cassels, A. C., F. M. Cocker, 1982. Seasonal and physiological aspects of the isolation of tobacco protoplasts, *Physiol Plant*, 56: 69-79.
- Cocking, E. C., 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles, *Nature* (Lond.) 187: 962-963.
- Collander, R., 1959. Cell membranes: their resistance to penetration and their capacity for transport, In Steward, F. C., *Plant Physiology*, Academic Press, New York, 2: 3-102.
- Davis, L. G., M. D. Dibner, and J. F. Battey, 1986. *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier: 42-43.
- Kamiya, N. and K. Kuroda, 1973. Dynamics of cytoplasmic streaming in a plant cell, *Biotechnology*, 10: 179-187.
- Kaiser G. and U. Heker, 1983. Photosynthesis of leaf cell protoplasts and permeability of the plasmalemma to some solutes, *Planta* (berlin) 157: 462-470.
- Kao, K. N., and M. R. Michayluk, 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts, *Planta*, 115: 355-367.
- Keller, W. A. and G. Melchers, 1973. The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion, *Z Naturforsch.* 28: 737-741.
- Masterson R. and J. Schell, 1989. Transgenic plants and the study of plant development. *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 3 ed by F. Eckstein and D. M. J. Lilley, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-268.
- Palta, J. P., J. Levitt and E. J. Stadelmann, 1978. Plant viability assay. *Cryobiology*, 15: 249-255.
- Power, J. B., S. E. Cummins and E. C. Cocking, 1970. Fusion of isolated plant protoplasts, *Nature*, 225: 1016-1018.
- Scott, O. R. and A. J. Bendich, 1988. Extraction of DNA from tissues: *Plant Molecular Biology* (manual) ed. by S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, A6: 1-10.
- Stadlemann, E. J., and Okyoung Lee-Stadlemann, 1989. *Passive permeability*, Academic Press Inc.
- Walden, R. and J. Schell, 1990. Techniques in plant molecular biology—progress and problems, *Eur. J. Biochem*, 192: 563-576.
- Weising K., J. Schell and G. Kahl, 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications, *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477.

Wu Boji, Yaya Cui and Yiping Chen, 1988.
Forcing intercellular chromatin migration between the embryogenic cells of *N. tabacum* and *s. oleraceae* by artificial motive force and the subsequent-regeneration of hybrid plants,

Scientia Sinica (series B) 31(2) : 187-194.

Zimmermann, U. and P. Scheurich, 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields, *Planta*. 151 : 26-32.