

인삼 캘러스 원형질체의 배양에 따른 세포벽 재생의 전자현미경적 연구

박종범

신라대학교 자연과학대학 생물학과

An Electron Microscopic Study on the Cell Wall Regeneration of Cultured *Panax ginseng* Callus Protoplast

PARK, Jong-Bum

Department of Biology, Silla University, Pusan, 617-736, Korea

Ultrastructural changes of the isolated and cultured protoplasts from ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) callus were studied with electron microscopy. In the 3-day-cultured protoplasts, the cell organelles such as rough endoplasmic reticulum, ribosome, Golgi complex, mitochondria, proplastid increased in number and observed microtubules. Many vesicles derived from the Golgi complex were evenly distributed in the cytoplasm. Some of such vesicles protruded the outer surface of the plasmalemma, and formed the protuberances. Vacuole derived from endoplasmic reticulum included Golgi vesicles by the invagination of vacuoles. These vacuoles migrated toward the plasmalemma by a fusion process (exocytosis), after fusing the plasmalemma the cell wall materials released from the outer surface of the plasmalemma, and lastly deposited on the plasmalemma. Proplastids containing many starch grains, and microtubules parallel to the plasmalemma were observed near the plasmalemma. Connected fibrils which were observed on the outer surface of the 3-day-cultured protoplast were interpreted as the component of cellulose.

Key word: Fibril, *Panax ginseng*, Protoplast, Ultrastructural change

식물 원형질체는 적절한 배양조건에서 배양하면 새로운 세포벽이 재생되기 때문에 세포벽 형성과정을 연구하는데 매우 유용한 실험재료이다. 고등식물의 세포벽 형성에 대하여는 토마토 과피세포에서 분리한 원형질체에서 최초로 연구되었으며(Pojnar et al., 1967), 배양 1주일 이내에 원형질체에서 새로운 세포벽이 형성되었음이 보고되었다(Horine and Ruesink, 1972; Robenek and Peveling, 1977). 특히 담배 엽육세포 원형질체의 배양에서는 세포벽이 형성되어야만 세포분열이 일어났음이 관찰되어 세포벽 재생이 고등식물 원형질체의 배양에 선행 필수조건임을 보고하였다(Schilde-Rentschler, 1977). 이후 식물 원형질체의 세포벽 재생에 관한 연구가 활발하게 진행되었으며, 전자현미경을 이용한 원

형질체 내부 미세구조의 변화 관찰 등 형태학적, 세포조직학적 연구도 수행되었다.

담배 엽육세포 원형질체를 배양하여 투과전자현미경으로 관찰하였을 때 소포체가 원형질막에 밀접하게 위치하고 있었으며 골기체와 소낭의 수가 증가하였다(Roland, 1973). 또한 골기체 소낭속에 세포벽 형성 물질이 들어있는 것이 관찰되어 이들이 세포벽 형성 물질을 합성한다고 하였다(Burgess and Fleming, 1974). 콩(*Glycine max*)의 현탁배양세포에서 분리한 원형질체를 배양하였을 때 골기체에서 유래된 coated vesicle이 많이 형성되어 있음이 관찰되어 골기체가 세포벽 형성에 중요한 역할을 하고 있음을 강력히 시사하였다(Tanchak et al., 1984). 한편 운향과의 1종인 *Skimmia*

*japonica*의 엽육세포와 캘러스세포의 원형질체에서 소포체의 양이 엽육세포나 캘러스세포에서보다 훨씬 증가되었다. 따라서 소포체로부터 섬유소 전구체 물질이 생산된다고 하여 소포체가 세포벽 형성과 밀접한 관련이 있음을 주장한 보고도 있다(Robenek and Peveling, 1977). 또한 Pansy(*Viola tricolor*) 엽육조직과 흰제비꽃(*V. patrinii*) 엽병의 캘러스 원형질체를 전기융합시켰을 때 원형질막과 평행으로 배열된 소포체와 전색소체가 관찰되었으며, 이는 세포벽 재생을 위하여 세포질이 활성화되었음을 의미한다고 보고하였다(Kwon et al., 1992).

배양된 담배 엽육세포 원형질체의 원형질막 표면을 주사전자현미경으로 조사하였을 때 원섬유(fibril)와 비슷한 구조가 관찰되었는데 이 구조는 섬유소 성분으로 구성되어 있었고, 이는 원형질막 표면에서 중합과정을 거쳐 섬유와 비슷한 구조로 형성된다고 보고하였다(Herth and Meyer, 1977; Burgess et al., 1977). 이와 같이 배양된 원형질체 표면에 섬유소 성분의 원섬유가 존재함은 여러 연구자들에 의해서 관찰된 바 있다(Williamson et al., 1977; Burgess et al., 1978).

이상과 같이 고등식물의 여러 조직에서 분리, 배양한 원형질체를 실험재료로 하여 원형질체의 내부구조 변화 및 원형질막 표면을 전자현미경으로 관찰하여 원형질체 내의 세포기관들과 세포벽 재생과의 상호 관련성을 규명하려는 많은 연구에도 불구하고 세포벽 물질의 합성에 관여하는 세포기관과 그의 역할 및 세포벽 재생 과정에 대하여는 정확하게 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구는 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 캘러스로부터 분리한 원형질체를 적절한 배양조건에서 배양하면서 이에 따른 원형질체 내부의 미세구조 변화와 원형질막 표면의 변화를 전자현미경으로 관찰하여 세포기관들과 세포벽 재생과의 연관성을 연구할 목적으로 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

시중에서 구입한 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 뇌두 조직편을 배양하여 유도한 캘러스조직을 원형질체 분리 및 배양의 실험재료로 사용하였다.

원형질체 분리 및 배양

50 mL Erlenmeyer flask에 0.5% macerozyme과 1.5% cellulase가 첨가된 효소용액 10 mL을 넣고 그 속에 계대배양하여 얻어진 연한 캘러스조직 1 g을 넣어서 약 27-28°C에서 3-5시간 진탕(45-50 rev/min.)시켰다. 진탕 후 얻어진 세

포현탁액을 직경 100 μ m pore mesh로 여과시킨 다음 원심분리(100 x g, 5 min.)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 x g, 5 min.)하여 살아있는 원형질체만을 순수분리하였다. 순수분리된 원형질체는 Pasteur pipette을 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 배양액으로 3회 원심분리하여 세척하였다. 원형질체 배양은 liquid-on-agar 배양법을 이용하여 0.8% agar를 첨가시킨 원형질체 배지를 직경 50 mm plastic petri dish에 2.5 mL 정도 얇게 깔아 굳힌 다음, 원형질체의 밀도가 5×10^4 - 10^5 /mL인 원형질체 현탁액 1.0 mL를 접종한 후 parafilm으로 밀봉하여 25 \pm 1°C에서 암배양하였다.

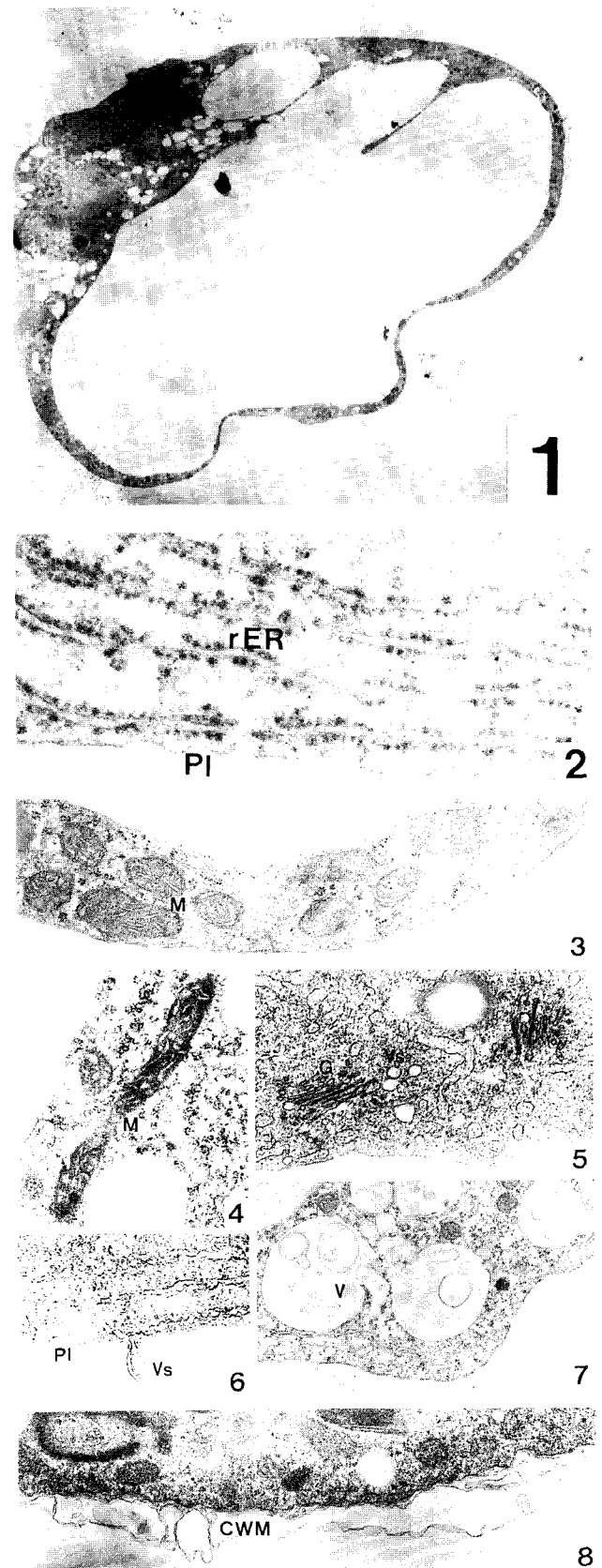
전자현미경 관찰

투과전자현미경 관찰을 위하여 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일동안 배양된 각 원형질체를 원심분리하여 모은 다음 0.4 M mannitol이 첨가된 2.5% glutaraldehyde - 2% paraformaldehyde용액으로 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 여과지측면에 silver paint로 mounting하였다. 동판에 부착된 재료는 ion spotter에 넣고 gold-paladium으로 이온증착시켜 주사전자현미경(JEOL EM-ASID-4D)으로 40 kV에서 관찰, 촬영하였다.

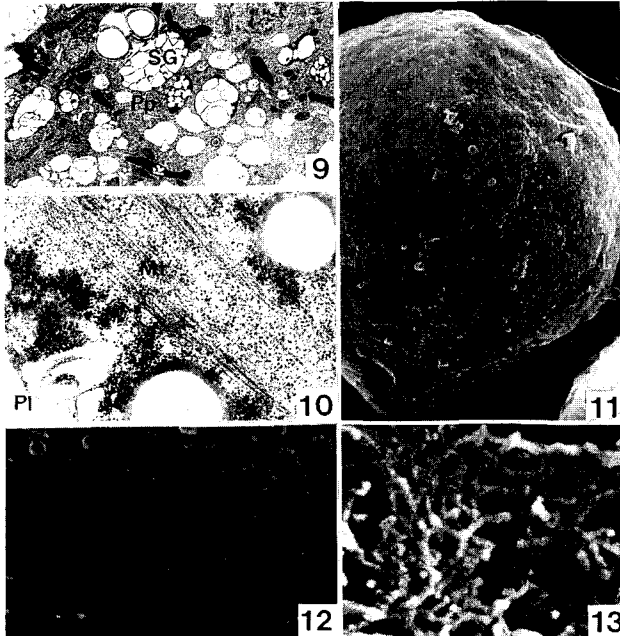
결 과

배양 1일 후부터 원형질체는 세포의 크기가 커지고 길이가 신장되어 난형을 이루다가 배양 3일 후에는 타원형으로 변화하였다(Figure 1). 배양 3일 후의 원형질체는 분리된 직후

의 원형질체보다 소포체, 리보솜, 미토콘드리아, 골기체 등 세포기관들의 수가 증가하였다(Figures 2, 3, 5). 소포체는 대부분 리보솜이 붙어 있는 조면소포체로서 세포질 전체에 분포하였고 원형질막과 평행으로 배열되어 있었는데(Figure 2), 이러한 조면소포체는 배양시간이 4-5일 경과된 원형질체에서도 관찰되었다. 미토콘드리아는 보통 구형이나 난형의 활성화된 형태로 세포질 전체에 분포하였고(Figure 3), 가끔 매우 길게 신장된 것도 관찰되었다(Figure 4). 골기체는 곧고 짧은 cisternae로 구성되어 있었고 그 주위에 많은 소낭들이 형성되어 있었으며, 이들은 소포체와 밀접하게 위치하여 세포질속에 분산되어 있었다(Figure 5). 골기체에서 유래된 골기소낭들은 원형질막 주위에 많이 밀집되어 있었는데, 가끔 소낭이 원형질막 바깥으로 돌출되어 있는 것도 관찰되었다(Figure 6). 또한 배양 3일후의 원형질체에서는 많은 액포들이 존재하였는데, 골기소낭들이 액포안에 들어 있는 것도 관찰되었다(Figure 7). 이들 액포는 원형질막 근처에 배열하였으며, 원형질막과 융합하여 액포안에 들어 있던 물질들을 원형질막 바깥으로 방출하였는데, 그 결과 세포벽 물질들이 원형질막 위에 침적되어 있는 것이 관찰되었다(Figure 8). 배양 5일 후의 원형질체에서는 배양 초기 원형질체에서 관찰되지 않았던 전색소체(proplastid)와 미소관(microtubule)이 관찰되었다(Figures 9, 10). 전색소체안에는 전분립들이 풍부하게 들어 있었는데, 가끔 lamella구조가 발달되어 있는 것도 관찰되었다(Figure 9). 미소관들은 원형질막 근처에 많이 존재하고 있었는데 대부분 원형질막과 거의 평행으로 배열하고 있었다(Figure 10). 배양된 원형질체를 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 12시간 배양된 원형질체 막 표면에는 이중막 구조의 조그마한 소낭들이 돌출되어 있는것이 관찰되었다(Figure 11). 배양 1일 후에는 가늘고 짧은 원섬유들이 원형질막 표면에 형성되어 있었으며(Figure 12), 배양 3-4일 후에는 원섬유들의 양이 많아지고 이웃한 원섬유들과 서로 공간적인 상호관계를 맺으면서 많은 양이 다발처럼 꼬여진 것이 관찰되었다(Figure 13).



Figures 1-8. Transmission electron micrograph of 3-day-cultured protoplasts. Figure 1. The cultured protoplast with elliptical shaped. x 600. Figure 2. Rough endoplasmic reticulum(rER) arrayed parallelly to the plasmalemma (PI). x 27,000. Figure 3. Numerous spherical shaped mitochondria (M) in cytoplasm x 40,000. Figure 4. Mitochondria (M) with elongated shape. x 27,000. Figure 5. Vesicles (Vs) formed at the maturing face of golgi complex (G). x 60,000. Figure 6. A region of plasmalemma (PI) protruded toward the outer surface, note the protuberance has a vesicle (Vs). x 40,000. Figure 7. Vacuole (V) containing numerous vesicles. x 27,000. Figure 8. Cell wall materials (CWM) deposited at the surface of plasmalemma. x 10,000.



Figures 9-10. Transmission electron micrograph of 5-day-cultured protoplasts. Figure 9. Proplastid (Pp) containing prominent starch grains (SG). x 7,000. Figure 10. Microtubules (Mt) paralleled to plasmalemma (Pl). x 20,000.

Figures 11-13. Scanning electron micrograph of cultured protoplasts. Figure 11. Protoplast after 12 hrs of culture. Protuberances are prominent at the surface of plasmalemma. x 3,000. Figure 12. Protoplast after 1 day of culture. The protoplast surface is covered with short fibrils (F). x 20,000. Figure 13. Protoplast after 3-4 days of culture. The fibrils show net-work formation which appears to be interconnected each other. x 20,000.

고 찰

인삼 캘러스 원형질체를 적절한 배양조건에서 배양하면 구형의 원형질체가 점차 신장되어 난형으로 모양이 변하였고, 소포체, 골기체, 미토콘드리아, 전색소체, 미소관 등 여러 세포소기관들의 수가 증가하는 등 원형질체 내부에서 많은 생리적 활성화변화가 일어났다. 배양된 원형질체에서의 세포소기관의 증가 현상은 원형질체가 매우 활성화되었음을 나타내고 있고, 이러한 활성화는 모두 앞으로 원형질체의 세포벽 형성과 세포분열에 대비한 것으로 보인다(Fowke et al., 1973; Robenek and Peveling, 1977; Kwon et al., 1992). 배양 초기의 원형질체 세포질 속에는 많은 골기체가 존재하고 있는데, 이들 골기체는 곧고 짧은 cisternae로 구성되어 있고 그 주위에 많은 소낭들이 형성되어 있었다. 콩과 식물의 1종인 *Vicia faba*의 뿌리 정단 세포에서 세포벽 형성과정

을 연구한 결과, 골기체가 소낭을 형성하고 이들이 세포 밖으로 방출되어 새로운 세포벽이 형성된다고 하였다(Gaham and McLean, 1969). Ray등(1969)은 완두콩 줄기의 원형질체에서 다당류 생합성에 관여하는 효소(glucan synthetase I)가 골기체에서 합성된다고 하였다. 그들은 이 효소를 갖고 있는 소낭들이 골기체에서 떨어져 나와 원형질막 쪽으로 이동하여 소낭 내의 효소들이 방출되어 원형질막 표면에 세포벽이 형성된다고 하였다. 발아하고 있는 밀의 근단과 경단세포에 alkaline silver hexamine 염색시약을 처리한 결과, 골기체와 골기소낭 그리고 세포벽에서 똑같은 염색성을 나타내고 있음이 관찰되었는데, 이 염색성은 이들이 모두 세포벽 성분인 섬유소(cellulose)로 구성되어 있음을 증명한다고 보고하였다(Pickett-Heaps, 1968). 또한 골기체가 섬유소 합성효소를 합성하고 이 효소는 소낭을 통해 원형질막으로 이동하여 거기에서 합성효소가 활성화되어 세포벽이 형성된다는 보고도 있다(Kiermayer and Dobberstein, 1973). 이러한 연구보고들은 골기체와 골기소낭들이 섬유소 합성 및 세포벽 형성과정과 매우 밀접한 연관성이 있다는 사실을 지지하여 주고 있다.

배양 3일 후의 원형질체에서 작은 액포들이 관찰되었는데, 액포속에는 소낭들이 들어 있었다. 이러한 액포들은 세포질분리체에 의해 형성되었으며(Sekhar and Sawheney, 1985), 소낭들은 골기체에서 유래된 것으로 액포막의 함입에 의하여 액포속으로 들어가는 것으로 생각된다. 발아된 옥수수의 근단세포에서 액포는 식세포작용에 의하여 여러 가지 세포내 구성구조(리보솜, 미토콘드리아, 여러 막 조각들)를 포함하고 있으며, 이러한 액포들은 서로 융합을 하여 큰 액포가 되고 이 현상이 계속됨으로써 일정한 방향으로 액포속에 포함된 물질들을 수송하였다(Matile, 1978). 본 실험에서도 많은 작은 액포가 서로 융합을 계속하여 차차 큰 액포로 되었으며, 이 액포는 점차 원형질막 쪽으로 이동한 후 원형질막과 융합하여 골기소낭내의 세포벽 물질이 원형질막 밖으로 방출되어 표면에 침적되어 있는 것이 관찰되었는데, 이들은 세포벽 물질인 섬유소가 원형질막 표면에서 중합하여 미소원섬유(microfibril)형태로 형성되는 것으로 해석된다. 식물세포에서 골기소낭이 세포벽 단백질과 다당류의 분비를 증계하는 역할을 하며(Robinson and Kristen, 1982), 이러한 세포벽 단백질이나 세포벽 다당류는 골기소낭이 exocytosis에 의하여 원형질막쪽으로 이동하여 원형질막과 융합한 후 소낭내의 세포벽 물질을 방출하여 원형질막 바깥에 침적되었다(Nakamura and Miki-Hiroshige, 1982). 배양된 원형질체의 원형질막 근처에 미소관이 평행으로 배열되어 있는 것이 관찰되었는데, 미소관들은 골기소낭내의 세포벽 형성물질이 원형질막에 침적되어 미소원섬유를 형성할 때 방향성을 결정하여 주는 것으로 해석되며, 이러한 미소관의 방향성은 새로이 형성될 세포벽의 미소원섬유의 방향성과 일치하는 것으로 보고된 바 있다(Palevitz, 1980).

미소관과 세포벽 형성과의 관계를 조사한 연구보고에 의하면, 미소관은 세포벽 구성물질인 미소원섬유의 침적과 배열에 직접적으로 관여한다고 보고하였다(Marchant and Hines, 1979; Lloyd et al., 1979).

12시간 배양된 원형질체의 표면에 형성되어 있는 돌기는 골기소낭내의 세포벽 물질이 원형질막 바깥으로 방출된 것으로 보이고, 여기에서부터 가늘고 긴 미소원섬유가 형성된 것으로 관찰되었는데, 배양시간이 경과할수록 원섬유가 계속 형성되어 이웃한 원섬유와 서로 상호 연결되어 있었다. 이는 원섬유의 형성은 식물세포의 원형질막 표면에서 일어난다는 보고(Chrispeels, 1976; Robinson, 1977)와, 새로이 형성된 세포벽은 느슨하게 배열된 미소원섬유의 그물체 형태로 구성되어 있다는 보고(Robinson and Preston, 1972)등과 본 연구 결과가 거의 일치함을 보여 주고 있다. 또한 담배엽육 원형질체를 배양하였을 때나(Herth and Meyer, 1977), 콩의 현탁배양 세포의 원형질체를 배양하였을 때 원형질체의 표면에 형성된 원섬유가 섬유소로 구성되어 있음이 보고된 바 있다(Klein and Delmer, 1979). 당근 배양세포의 원형질체에서도 원형질체 배양 24시간 후에 섬유소가 형성되었는데 처음에는 짧은 polymer를 형성하다가 점차 배양시간이 길어짐에 따라 정상적인 길이의 섬유소 사슬을 형성한다고 보고하였다(Asamizu et al., 1977). 본 실험에서도 배양된 원형질체의 표면에 형성된 미소원섬유는 정상세포의 세포벽 성분인 섬유소로 구성되어 있음이 0.1% cellulfluor 형광액으로 확인할 수 있어 이러한 보고들을 지지하여 주고 있다.

적 요

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 캘러스로부터 분리한 원형질체를 배양하면서 배양시간에 따른 원형질체의 미세구조 변화와 원형질막 표면을 전자현미경으로 조사하였다. 3일 동안 배양된 원형질체에서는 조면세포체, 리보솜, 골기체, 미토콘드리아, 전색소체 등의 세포기관들의 수가 증가하였고 미소관도 관찰되었다. 골기체 주변에는 많은 골기소낭들이 형성되어 세포질 전반에 존재하였고, 이들 소낭들은 원형질막 바깥으로 돌출되어 돌기를 형성하기도 하였다. 세포체에서 유래된 액포속에는 액포의 합입에 의하여 골기소낭들이 들어 있는데, 이들 액포들은 융합에 의한 exocytosis로 원형질막 근처로 이동하여 원형질막과 융합한 다음, 세포벽 물질을 원형질막 바깥으로 방출하여 원형질막에 침적하였다. 전색소체는 많은 전분립을 함유하고 있었고, 미소관들은 원형질막 근처에서 막과 평행으로 배열하고 있었다. 배양된 원형질체의 표면에는 섬유소로 구성되어 있는 원섬유들이 서로 연결되어 있는 것이 관찰되었다.

인 용 문 헌

- 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
- Burgess J, Fleming EC (1974) Ultrastructural observation of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts. *J Cell Sci* 14: 439-449
- Burgess J, Linstead PJ, Fisher VEL (1977) Studies of higher plant protoplasts by scanning electron microscope. *Micron* 8: 113-122
- Burgess J, Linstead PJ, Bonsall VE (1978) Observation on the time course of wall development at the surface of isolated protoplasts. *Planta* 139: 85-91
- Chrispeels MJ (1976) Biosynthesis, intracellular transport and secretion of extracellular macromolecules. *Annu Rev Plant Physiol* 27: 49-58
- Fowke LC, Bech-Hansen CW, Gamborg OL, Shylu JP (1973) Electron microscopic observations of cultured cells and protoplasts of *Ammi visnaga*. *Amer J Bot* 60: 304-312
- Gaham PG, McLean J (1969) Subcellular localization and possible functions of acid β -glycerophosphatases and naphthol esterases in plant cells. *Planta* 89: 126-135
- Herth W, Meyer Y (1977) Ultrastructural and chemical analysis of the wall fibrils synthesized by tobacco mesophyll protoplasts. *Biol Cellulaire* 30: 33-40
- Horine RK, Ruesink JP (1972) Cell wall regeneration around protoplasts isolated from *Convolvulus* tissue culture. *Plant Physiol* 50: 438-445
- Kiermayer O, Dobberstein B (1973) Membrankomplexe dictyosomaler herkunft als "Matrizen" für die extrapasmatische synthese und orientierung von mikrofilamenten. *Protoplasma* 77: 437-451
- Klein AS, Delmer DP (1979) Characterization of the regenerating wall of soybean protoplasts. *Plant Physiol (suppl)* 63: 51
- Kwon OC, Chung CH, Sato T, Taniguchi T, Maeda E (1992) Ultrastructure of electrofused products from pansy (*Viola tricolor*) mesophyll and wild viola (*V. patrinii*) petiole callus protoplasts. *Jpn J Crop Sci* 61: 469-475
- 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, Hines ER (1979) The role of microtubules and cell wall deposition in elongation of regenerating protoplasts of *Mougeotia*. *Planta* 146: 41-48
- Matile Ph (1978) Biochemistry and function of vacuoles. *Ann Rev Plant Physiol* 29: 193-203
- Nakamura S, Miki-Hiroshige H (1982) Coated vesicles and cell plate formation in the microspore mother cell. *J Ultrastruct Res* 80: 302-311
- Palevitz BA (1980) The structure and development of stomatal cells. In: *Soc Exp Biol Sem Ser Stomatal physiology*. (Jarvis PG, Mansfield TA,

- eds.) Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Pickett-Heaps JD** (1968) Further ultrastructural observations on polysaccharide localization in plant cells. *J Cell Sci* **3**: 55-61
- Pojnar E, Willison JHM, Cocking EC** (1967) Cell wall regeneration by isolated tomato-fruit protoplasts. *Protoplasma* **64**: 460-480
- Ray PM, Shininger TL, Ray MM** (1969) Isolation of β -glucan synthetase particles from plant cells and identification with golgi membranes. *Proc Natl Sci USA* **64**: 605-613
- Robenek H, Peveling E** (1977) Ultrastructure of the cell wall regeneration of isolated protoplasts of *Skinimia japonica* Thunb. *Planta* **136**: 135-145
- Robinson DG** (1977) In "Advances in botanical research" (H.W.Woolgouse, ed.) Vol 5, pp 89-151. Academic Press, New York
- Robinson DG, Kristen U** (1982) Membrane flow via the golgi apparatus of higher plant cells. *Int Rev Cytol* **77**: 89-127
- Robinson DG, Preston RD** (1972) Plasmalemma structure in relation to microfibril biosynthesis in *Oocystis*. *Planta* **104**: 234-246
- Roland JC** (1973) The relationship between the plasmalemma and the plant cell wall. *Int Rev Cytol* **36**: 45-92
- Schilde-Rentschler L** (1977) Role of the cell wall in the ability of tobacco protoplasts to form callus. *Planta* **135**: 177-181
- Sekhar KNC, Sawheney VK** (1985) Ultrastructure of the shoot apex of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Amer J Bot* **73**: 1813-1822
- Tanchak MA, Griffing LG, Mersey BG, Fowke LC** (1984) Endocytosis of cationized ferritin by coated vesicles of soybean protoplasts. *Planta* **162**: 481-486
- Williamson FA, Fowke LC, Weber G, Constabel F, Gamborg O** (1977) Microfibril deposition on cultured protoplasts of *Vicia hajastana*. *Protoplasma* **91**: 213-219

(1998년 7월 16일 접수)