토마토 뿌리조직으로부터 두 단계 삼투압 처리에 의한 원형질체의 분리

신대섭 · 한민우 · 김영기*

충북대학교 농과대학 농화학과

(2004년 2월 17일 접수, 2004년 3월 12일 수리)

이온채널의 활성을 포함한 세포의 생리활성을 측정하기 위하여 토마토의 뿌리조직으로부터 원형질체를 분리하였다. 일반적으로 널리 사용되는 원형질체 분리법은 뿌리조직의 경우 효율이 좋지 않았다. 따라서, 다양한 조건을 변화시키며 분리효율을 조사하던 중 두 단계의 삼투압 처리로 원형질체 분리효율이 높아짐을 확인하였다. 첫 단계로 뿌리조직을 300 mM sorbitol을 포함하는 용액에서 30분간 배양한 후, 700 mM sorbitol과 세포벽 분해효소를 포함하는 용액으로 옮겼을 때, 원형질체 형성은 급격히 증가하였다. 이러한 분리방법의 최적 조건을 결정하기 위하여 pH와 삼투압, 배양시간, 세포벽 분해효소의 농도 등을 조사하였다. 원형질체 분리의 수율은 3% cellulase와 1% macerozyme, 0.1% pectolyase를 포함하는 pH 5.0의 혼합효소액에서 2시간 배양할 때 최대로 나타났다. ATPase 활성으로 평가한 원형질체의 세포활성은 뿌리조직의 시료에서 측정한 값과 유사하였다. 또한, 분리한 원형질체의 세포활성은 4시간 동안 감소하지 않아 생리활성 측정을 위한 시료로 적합하였다. 본 결과는 두 단계 삼투압 처리법이 토마토 뿌리조직으로부터 높은 수율의 원형질체 분리에 성공적임을 보인다.

Key words: 원형질체, 토마토뿌리, ATPase, 삼투압처리

서 론

식물의 뿌리세포에서 원형질막에 위치하는 이온펌프와 이온채널, 이온 transporter 등의 생체막 단백질들은 양분의 흡수 및 세포질의 pH, 삼투압, 막전위 조절 등 다양한 세포 생리현상에 중요한 역할을 수행한다. 이들 단백질 효소들의 활성을 연구하기 위해서는 세포조직으로부터 안정하고 활성이 높은 원형질체를 분리하는 것이 선행되어야 한다. 식물 조직으로부터 원형질체의 분리는 세포벽 분해효소를 사용하여 이루어지며, 효소로는 cellulase 및 hemicellulase, pectinase 등이 가장 널리 사용된다. 이러한 원형질체의 분리 방법은 Cocking[1]에 의하여 토마토 열매에서 처음으로 이루어졌으며, 초기의 방법으로 분리한 원형질체는 안정성이 매우 낮았다. 이후 효소배양 조건이 개선되어 Zapata[2]와 Imanishi 등[3]은 원형질체의 분리 후 배양에 성공하였다. 또한 Shahin[4]은 토마토의 잎, 줄기 또는 자엽에서 원형질체를 분리한 후, 이들을 배양하여 shoot를 형성하였다고 보고하였다. 현재까지 토마토 잎과 줄기 등에서 원형질체를 분리하고 다양한 실험에 사용한 사례는 많이 보고되었지만,[5-7] 뿌리조직으로부터 원형질체를 분리하여 성공적으로 실험에 사용한 보고는 드문 실정이다.

본 연구는 염류집적 토양에서 작물체에 나타나는 생육장애의 원인을 구명하고 개선방안을 마련하기위한 장기적 목적으로 수행되고 있다. 생육장애시 이온채널을 통하여 나타나는 이온의 비정상적 이동은 미세전극을 이용한 patch clamp 방법으로 측정할 수 있으며,[8] 유리전극의 사용을 위해서는 깨끗한 세포막을 갖는 원형질체의 분리가 선행되야 한다. 따라서 안정하게 생체막 효소의 활성을 유지하는 원형질체를 분리하기 위하여 토마토 뿌리조직으로부터 삼투압, 세포벽 분해효소, pH 등 다양한 조건을 조합하여 원형질체 분리효율을 조사하였고, 두 단계의 삼투압 처리가 원형질체 형성에 효과적임을 확인하였다. 이렇게 얻어진 원형질체는 높은 세포활성을 갖고 있음을 확인하였다.

*연락저자
Phone: 82-43-261-2560; Fax: 82-43-271-5921
E-mail: ykkim10@chungbuk.ac.kr

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; DTT, 1,4-dithiothreitol; PVP, polyvinylpolypyrrolidone; BTP, 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane; MES, 2-(N-morpholino) ethane-sulfonic acid; PMSF, phenylmethylsulfonylfluoride

재료 및 방법

재료. 원형질체를 분리하기 위하여 사용한 토마토의 뿌리조직은 흥농종묘의 서광토마토(*Lycopersicon esculentum* L.; Pink Forcer) 종자를 발아하여 얻었다. 종자는 스펀지를 이용하여 빛을 주지 않은 상태로 25°C를 유지하며 증류수에서 약 3-5일간 발아시켰고, 발아 후 Cho 등[9]의 방법에 따라 제조한 양액이 담긴 플라스틱 용기에 이식하였다. 이식한 토마토는 온실에서 온도를 28-32°C로 유지하며 약 2주간 재배한 후 뿌리조직을 채취하여 실험에 사용하였다.

양액 제조에 사용한 시약은 모두 1급 이상의 시약을 사용하였다. 세포벽 분해효소인 cellulase(Onozuka R-10)와 macerozyme R-10은 DUCHEFA사(Netherlands)의 제품을 사용하였고, pectolyase Y-23은 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 원형질체 분리과정에 사용한 완충액의 제조와 원형질체의 활성 측정을 위한 enzyme-coupled assay에 사용한 pyruvate kinase (PK)와 lactate dehydrogenase(LDH) 등의 시약은 모두 Sigma사

에서 구입하였다.

토마토 뿌리조직에서 원형질체의 분리. 원형질체 분리를 위하여 사용한 효소용액은 Arabidopsis[10]와 maize[11]의 뿌리조직으로부터 원형질체를 분리하기 위하여 사용한 이전 연구들의 효소조성을 변형하여 사용하였다(500 mM sorbitol, 10 mM $CaCl_2$, 0.5% BSA, 5 mM DTT, 0.5% PVP, 2% cellulase, 2% macerozyme, 0.1% pectolyase, 5 mM MES, pH 5.5). 효소용액을 이용한 원형질체 분리과정은 Shin 등[3]의 방법을 기초로 하여 이루어졌다. 간략히, 토마토 뿌리조직을 약 0.1 g 정도 채취하여 증류수로 3회 세척한 후, 조직을 0.1 cm의 크기로 잘게 자른 다음, 2 ml의 효소용액에 옮겨 27℃에서 60 rpm으로 2시간 동안 부드럽게 진탕하였다. 세포벽 분해효소들에 의하여 유리된 원형질체를 분리하기 위해 용액을 60 μm 나일론 망으로 거른 후, 300×g로 5분간 원심분리하여 원형질체를 침강시켰다. 이후 상징액은 제거하였고, 유리된 대부분의 원형질체를 포함하는 침전물에 세포벽 분해효소를 포함하지 않는 700 mM sorbitol buffer를 뿌리 중량의 1/2(w/v)배인 50 μl 첨가하여 침전을 현탁한 후, haemacytometer를 이용하여 원형질체의 수를 측정하였다.

원형질체의 세포활성 평가. 원형질체의 세포활성은 Niggli 등[12]의 enzyme-coupled assay법을 변형한 Cho 등[5]의 방법으로 마이크로솜 ATPase의 활성을 측정함으로써 평가하였다. 먼저, 생체중량 1 g의 잘게 자른 토마토 뿌리조직을 효소처리한 후, 원형질체를 300×g로 10분간 원심분리하여 분리하고, 뿌리중량의 1/10배(w/v)인 100 μl의 완충용액(250 mM sucrose, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.1% BSA, 25 mM Tris-MES, pH 7.0)을 첨가하여 glass-Teflon homogenizer로 균질화한 용액의 ATPase 활성을 측정하였다. 또한, 비교실험을 위하여 사용된 마이크로솜은 세 가지 다른 방법으로 얻어졌다. 간략히 소개하면, 먼저 토마토 뿌리를 취하여 생체중량의 2배 완충용액을 첨가하고 food processor로 마쇄하였다. 이것을 초고속 원심분리하여 침전으로 whole tissue 용액을 얻었고, 마쇄한 용액을 3겹의 거즈로 여과한 현탁액을 초고속 원심분리하여 침전을 filtered tissue로 하였다. 마지막으로 뿌리조직으로부터 Cho 등[9]의 방법에 따라 분리한 원형질막 및 액포막 마이크로솜 분획을 purified membrane 시료로 사용하였다. 이렇게 분리한 4가지 시료의 단백질 함량은 Lowry방법[13]으로 측정한 후, 각각의 ATPase 활성 측정에 이용하였다.

결과 및 고찰

삼투압에 의한 원형질체 형성효과. 세포벽 분해효소를 이용한 식물세포의 원형질체 형성효율은 삼투압 조절에 크게 좌우된다. 특히, 뿌리의 조직세포로부터 원형질체의 형성은 타조직에 비하여 어려운 것으로 알려져 있다. 뿌리조직으로부터 원형질체 분리를 위한 효율적인 방법을 개발하기 위하여 다양한 삼투압 조건에서 원형질체 분리율을 조사하였다. Sorbitol을 사용한 삼투압 조절을 통하여 측정한 원형질체 형성효율은 극히 낮아 1×10^5 cell·ml^{-1} 이하의 원형질체가 발견되었다. 이러한 예비실험 과정에서 1차 처리된 조직을 더 높은 농도의 sorbitol 용액에 처리하였을 때, 많은 원형질체가 형성됨을 확인하였다. 따라서 두 단계의 삼투압 처리조건을 다양하게 분석하였다.

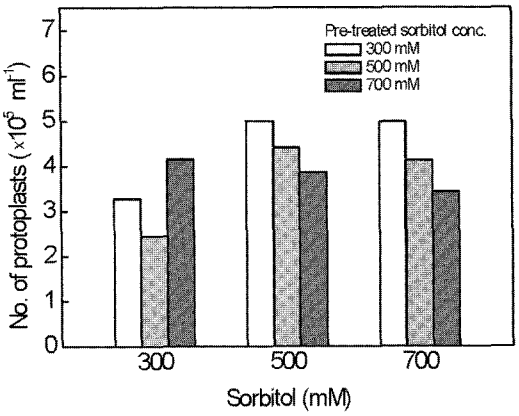

Fig. 1. Effect of sorbitol concentration on the formation of protoplasts. In order to increase the yield of protoplast formation, the osmotic pressure was adjusted with sorbitol by a two-step process. In the first step, root tissue was chopped and incubated in the solutions containing the indicated concentrations of sorbitol for 30 min (Pre-treated). In the following step, the concentration of sorbitol was adjusted as indicated and enzymes were added. The concentrations of enzymes, cellulase, macerozyme, and pectolyase, were 2, 2, and 0.1%, respectively.

첫 단계에서는 세포벽 분해효소를 첨가하지 않고 sorbitol을 300, 500, 700 mM로 가한 완충용액에 뿌리조직을 30분 동안 배양하였다. 이렇게 얻어진 조직은 다음 단계에서 각각 300, 500, 700 mM sorbitol을 포함하는 효소용액으로 옮겨져 2시간 동안 진탕 배양하여 원형질체를 분리하였다. 세포벽 분해효소는 cellulase와 macerozyme, pectolyase가 각각 2, 2, 0.1%가 되도록 일정하게 조절하였다. 이러한 조건에서 형성된 원형질체의 수는 300 mM sorbitol을 포함하는 완충용액에서 전처리한 후, 500 또는 700 mM sorbitol을 포함하는 효소용액에서 분리하였을 때, 약 5×10^5 cell·ml^{-1}로 가장 높게 나타났다(Fig. 1). 효소용액에 sorbitol의 농도가 700 mM일 때, 형성된 원형질체는 독립적으로 분리되어 발견되어 사용에 유리하였으며, 전처리로 500이나 700 mM sorbitol을 처리하였을 때는 오히려 원형질체의 분리율이 감소하였다.

두 단계 삼투압 처리에 의한 원형질체 형성 효율의 증가는 전처리에 의한 삼투압에서 세포가 수축하여 세포막과 세포벽 사이의 간격이 생김으로써 분해효소의 침투가 용이해지기 때문인 것으로 추측된다. 또한, 두 번째 단계에서 sorbitol의 농도가 낮은 경우에는 형성된 원형질체가 팽창하여 시간에 따라 파괴됨으로써 효율이 감소됨을 확인하였다.

효소 농도에 따른 효과. 토마토 뿌리조직으로부터 원형질체를 분리하기 위한 세포벽 분해효소로 cellulase와 macerozyme, pectolyase를 사용하였다. 효율적인 원형질체 분리를 위한 이들 세 가지 효소의 적정 농도를 결정하기 위하여 각각의 효소 농도에 따른 원형질체 수를 조사하였다. 세 가지 효소 중 한가지의 효소농도만을 변화시켰으며, 나머지 두 효소의 농도는 일정하게 유지하였다. 이때, 효소의 기본농도는 cellulase와 macerozyme, pectolyase가 각각 2, 2, 0.1%였다.

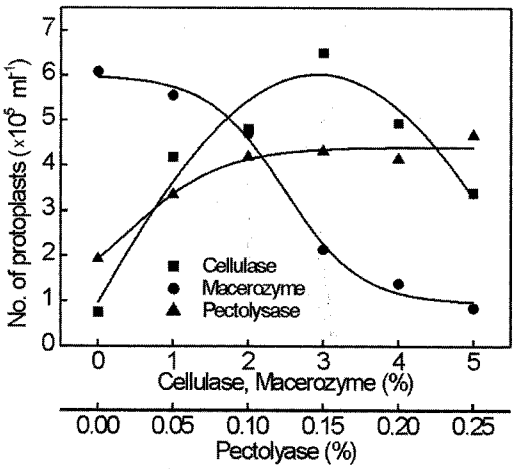

Fig. 2. Effects of cell wall-digesting enzymes on the formation of protoplasts. Combinations of three different enzymes were used to decompose cell wall structure for 2 hrs. The concentration of the indicated enzyme was adjusted under the fixed basic concentrations of the other two enzymes. The fixed basic concentrations of cellulase, macerozyme, and pectolyase were 2, 2, and 0.1%, respectively.

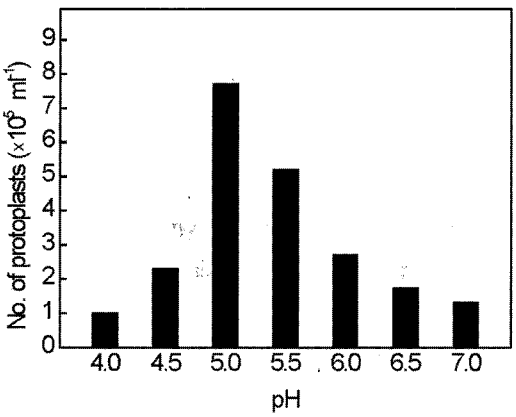

Fig. 3. Effect of pH on the protoplast formation. Concentrations of cellulase, macerozyme, and pectolyase were 2, 1, and 0.1%, respectively. The pH of enzyme solution was adjusted from 4.0 to 7.0 and protoplast formation was measured after 2 hr incubation.

먼저, cellulase의 농도를 5%까지 증가시켰을 때, 원형질체 형성은 3%에서 가장 크게 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다(Fig. 2, ■). 이러한 결과는 온실에서 재배한 토마토 엽육조직으로부터 원형질체 유리가 3% cellulase를 포함하는 효소용액에서 최대로 얻어졌다는 이전의 보고와 동일하였다.[5] 한편, pectolyase의 농도를 0.25%까지 증가시키며 분리한 원형질체의 수를 조사하였을 때, 0.1%에서 효율은 pectolyase를 첨가하지 않을 경우보다 약 2배정도 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 일정하였다(Fig. 2, ▲). Macerozyme의 농도에 따른 원형질체 형성은 2% 이상을 첨가할 경우 원형질체수가 급격히 감소하였다(Fig. 2, ●). 즉, 2% cellulase와 0.1% pectolyase를 포함하는 조건에서는 macerozyme의 농도가 2%이상으로 증가되면 오히려 원형질체의 분리효율이 감소함을 확인하였다. 이상의 결과로부터 효율적인 원형질체 형성을 위한 효소농도는 3% cellulase와 1% macerozyme, 0.1% pectolyase의 혼합조건임을 확인하였다. 이후 원형질체의 분리는 이러한 혼합효소 조건에서 이루어졌다.

pH 효과. 원형질체의 형성에 미치는 효소완충액의 pH 효과는 pH를 4.0에서 7.0까지 변화시키면서 측정하였다. 먼저, pH를 조절한 각각의 효소용액에서 토마토 뿌리 조직을 2시간동안 진탕 배양한 후, 형성된 원형질체를 분리하였다. 이때 분리된 원형질체의 수는 효소용액의 pH가 5.0일 때 최대였으며, 약 8 $\times 10^5$ cell · ml^{-1}이었다(Fig. 3). 효소용액의 pH는 세포벽 분해를 위하여 사용한 효소들의 활성과 밀접한 연관이 있다. 여러 가지 식물조직을 대상으로 원형질체를 분리한 기존의 보고에서 가장 일반적으로 사용된 pH 범위는 5.5-6.0이었다.[14-17] 이것은 기존의 보고가 잎이나 줄기에서 얻어진 결과라는 점에서 뿌리를 대상으로 한 본 연구와 비교된다.

배양시간에 따른 효과. 세포벽의 효소분해로 얻어진 원형질체는 시간에 따라 원형질막이 불안정해지며 그로 인하여 세포의 활성이 감소하고 결국 원형질체가 파괴된다고 알려져 있다.[10] 즉, 배양시간의 지속에 따라 원형질체의 형성은 증가하나 동시에 파괴되는 수도 증가함으로 적정의 배양시간을 결정해야 한다. 시간에 따른 원형질체 형성의 정도를 조사하기 위하여 0.5-3시간까지 효소용액에서 원형질체를 분리하며 원형질체의 수를 조사하였다. 뿌리조직의 효소처리 시간이 증가할수록 원형질체의 수는 급격히 증가하였고, 약 2시간 후에는 원형질체의 수가 일정하게 유지되었다(Fig. 4). 배양시간을 3시간 이상으로 증가시켰을 경우는 더 이상 증가를 관측할 수 없었고, 오히려 점차 수가 감소하였다(자료 미제시). 이러한 결과로부터 원형질체 분리를 위한 효소의 처리시간은 2시간이 적절함을 확인하였다.

원형질체의 세포활성 측정. 분리된 원형질체의 세포활성을 측정하는 방법은 여러 가지가 알려져 있다. 간단한 방법으로는 원형질체를 fluorescein diacetate(FDA) 등의 형광물질로 염색하여 형광현미경 하에서 관찰함으로써 살아있는 세포의 수를 측정하는 것이다.[18,19] 이 방법은 세포에 존재하는 가수분해효소인 esterase의 활성을 통하여 생성되는 fluorescein의 형광을 측정하는 것으로 살아있는 세포를 직접 선별할 수 있지만, 세포막에 존재하는 다양한 효소단백질의 활성을 측정하는 것은 불가능하다.

본 연구에서는 enzyme-coupled assay를 이용하여 뿌리조직과 원형질체로부터 각각 분리한 ATPase의 활성을 측정함으로써 원형질체의 세포활성을 평가하였다. 이 방법에서 ATPase의 활성감소는 원형질체의 세포활성 감소를 나타내는 척도가 된다. 분리한 원형질체 시료의 ATPase 활성은 342±15 nmol · min^{-1} · mg^{-1} protein로 나타났다(Fig. 5). 이 값은 뿌리조직의 전체 균질액과 균질 후 여과액으로부터 각각 분리한 마이크로솜 ATPase의 활성인 340±38과 380±23 nmol·min^{-1}·mg^{-1} protein과 유사하였다. 그러나, 이 활성은 원심력을 달리하여 순수분리한 마이크로솜 ATPase의 활성인 679±11 nmol · min^{-1} · mg^{-1} protein에 비하여 약 50.4%의 값을 보였다. 이러한 결과는 세포벽 분해효소를 이용하여 원형질체를 분리하여도 분리한 원형질체 세포는 뿌리조직에서의 활성을 그대로 유지하고 있음을 보인다.

시간에 따른 원형질체의 세포활성변화. 식물세포로부터 세포벽을 제거하여 원형질체를 형성하면, 이 원형질체는 pH, 삼

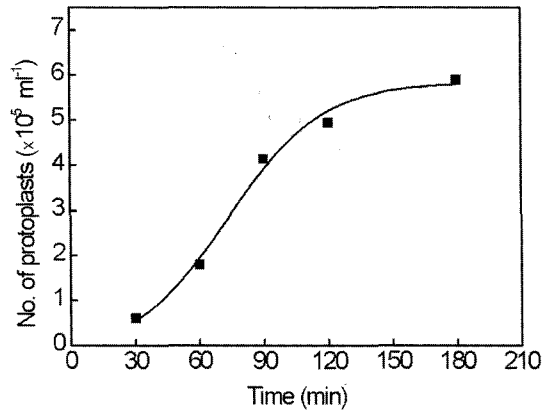

Fig. 4. Effect of incubation time on the protoplast formation. Incubation time for protoplast formation was adjusted from 0.5 to 3 hrs in the enzyme solution.

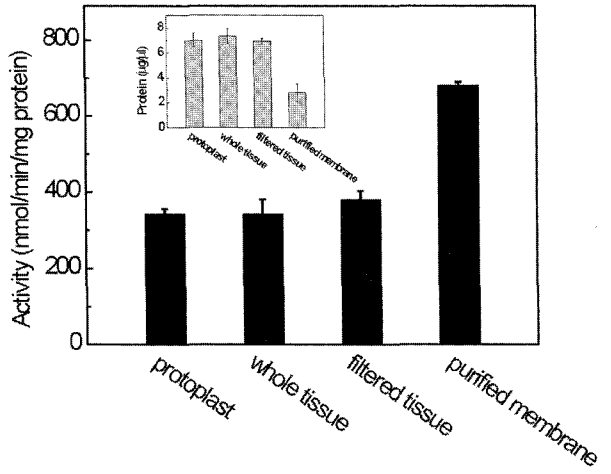

Fig. 5. ATPase activity prepared from the isolated protoplasts. In order to estimate the cellular activity of isolated protoplast, the activity of total ATPases was measured from the homogenated fractions of protoplasts and was compared with those activities of whole tissue extract, homogenated and filtered tissue extract, and purified membrane. ATPase activity of the isolated protoplast was 342 ± 15 nmol/min^{-1}/mg^{-1} protein. Inset shows the protein cocentration of each preparation. Values are means± SD (n=5).

투압, 온도, 광 등의 다양한 외부 환경에 노출되며, 이러한 요인에 의하여 원형질체의 세포활성은 변화할 수 있다. 따라서 시간에 따른 원형질체 시료의 ATPase 활성을 측정함으로써 원형질체의 세포활성 변화를 조사하였다. 원형질체 분리 후, ATPase의 활성은 4시간까지 감소하지 않았으나, 그 이후에는 점차 감소하여 10시간 후에 처음 활성의 약 70%에 도달하였고 더 이상의 감소는 나타나지 않았다(Fig. 6). 따라서, 분리한 원형질체는 세포활성이 약 4시간동안 유지되어 대부분의 생리활성 실험에 무리없이 사용될 수 있음을 확인하였다.

두 단계 삼투압 처리에 의한 뿌리조직 원형질체 분리방법은 원형질체의 분리효율뿐만 아니라 분리한 원형질체의 생리활성도 높음을 확인하였다. 결론적으로, 토마토 뿌리조직으로부터의 원형질체 분리를 위한 최적 조건은 300 mM sorbitol에서의 전처리와 700 mM sorbitol에서의 효소처리로 얻어졌으며, pH와

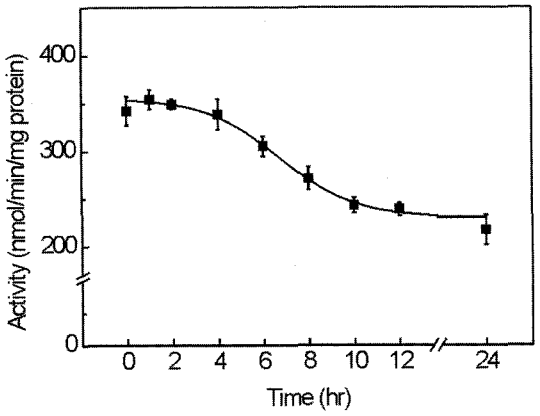

Fig. 6. Time-dependent changes in the ATPase activity of protoplast. The time dependence of ATPase activity was measured from the homogenated fractions obtained from the isolated protoplasts. The isolated protoplasts were incubated in the presence of 700 mM sorbitol. The ATPase activity was measured by an enzyme-coupled assay after fractions of the proplasts were taken and homogenated on the indicated time. Values are means± SD (n=3).

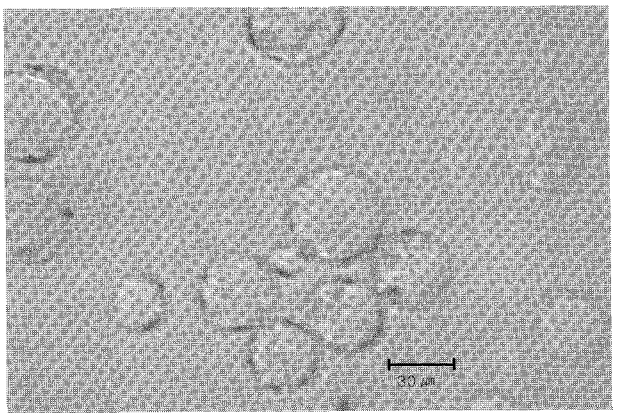

Fig. 7. Light micrograph of protoplasts isolated from roots of tomato plant. Bar = 30 μm.

효소농도, 배양시간 등의 조절로 원형질체의 분리효율을 1.6배 증가시킬 수 있었다. 이렇게 분리한 원형질체의 세포활성은 뿌리조직에서의 세포활성과 비교하였을 때 큰 차이를 보이지 않았다. 이 방법을 통하여 분리한 원형질체 크기는 20-50 μm로 다양한 분포를 보였으며(Fig. 7), 현미경 관측상 비교적 깨끗한 막을 갖고 있어 미세전극을 이용한 patch clamp 방법을 통하여 세포막의 이온채널 특성을 연구하기에 무리없이 사용될 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단지정 충북대학교 첨단원예기술개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

1. Cocking, E. C. (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vaculoes. *Nature* **187**, 962-963.

2. Zapata, F. J., Evans, P. K., Power, J. B. and Cocking, E. C. (1977) The effect of temperature on the division of leaf protoplasts of *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Sci. Lett.* **8**, 119-124.
3. Imanish, S. and Hiura, I. (1983) Culture and regeneration of *Lycopersicon peruvianum* leaf protoplasts. *Jpn. J. Breed* **33(4)**, 359-368.
4. Shahin, E. A. (1985) Totipotency of tomato protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* **69**, 235-240.
5. Chung, J. D., Lee, M. H. and Chun, C. K. (1986) Isolation and culture of protoplast of ornamental tomato (*Lycopersicon esculentum*×l. *pimpinelifolium* cv. Thny Tim). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **27(3)**, 289-303.
6. Shin, M. C. and Kim, S. G. (1989) Mesophyll protoplast culture of *Lycopersicon esculentum* Mill and *L. pimpinellifolium*. *Kor. J. Genetics* **11(3)**, 147-154.
7. Sebastiani, L., Lindberg, S. and Vitagliano, C. (1999) Cytoplasmic free Ca^{2+} dynamics in single tomato (*Lycopersicon esculentum*) protoplasts subjected to chilling temperatures. *Physiologia Plantarum* **105**, 239-245.
8. Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. and Sussman, M. R. (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**, 918-921.
9. Cho, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (1998) Characterization of microsomal ATPases prepared from tomato roots. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 130-136.
10. Demidchik, V. and Tester, M. (2002) Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* **128**, 379-387.
11. Kollmeier, M., Dietrich, P., Bauer, C. S., Horst, W. J. and Hedrich, R. (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiol.* **126**, 397-410.
12. Niggli, V., Penniston, J. T. and Carafoli, E. (1979) Purification of the (Ca^{2+}-Mg^{2+})-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* **254**, 9955-9958.
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
14. Ramahaleo, T., Morillon, R., Alexandre, J. and Lassalles, J. (1999) Osmotic water permeability of isolated protoplasts. Modifications during development. *Plant Physiol.* **119**, 885-896.
15. Hayward, C. and Power, J. B. (1975) Plant production from leaf protoplasts of *Petunia parodii*. *Plant Sci. Lett.* **4**, 407-410.
16. Schwenk, F. W., Pearson, C. A. and Roth, M. R. (1981) Soybean mesophyll protoplasts. *Plant Sci. Lett.* **23**, 153-155.
17. Wilson, H. H., Styer, D. J., Conrad, P. L., Durbin, R. O. and Helgeson, J. P. (1980) Isolation of sterile protoplasts from unsterilized leaves. *Plant Sci. Lett.* **18**, 151-154.
18. Balestri, E. and Cinelli, F. (2001) Isolation and cell wall regeneration of protoplasts from *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany* **70**, 237-242.
19. Sheen, J. (2001) Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* **127**, 1466-1475.

Isolation of Protoplasts from Tomato Root by Two-step Osmotic Treatment

Dae-Seop Shin, Min-Woo Han and Young-Kee Kim* (*Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, 361-763, Korea*)

Abstract: In order to measure cellular physiological activity including ion channel activity, protoplasts were isolated from the root tissue of tomato plant. The general methods recommended were not efficient enough to make protoplasts from the root tissue. Among various conditions tested, we found that a two-step treatment of osmosis is very efficient for the isolation of protoplasts. In this procedure, root tissues were preincubated in a solution containing 300 mM sorbitol for 30 min. Then, they moved to the reaction solution containing 700 mM sorbitol as well as cell wall-digesting enzymes. The formation of protoplast was greatly increased by this method. In order to find the optimal condition of the two-step method, various conditions of pH, osmotic pressure, incubation time, and the concentrations of cell wall-digesting enzymes were tested. The yield of protoplast isolation was maximal at pH 5.0 after 2 hr incubation. Mixed enzymes of 3% cellulase, 1% macerozyme, and 0.1% pectolyase showed maximal protoplast isolation. The physiological activity of isolated protoplast evaluated by measuring the cellular ATPase activity was as high as that measured from the preparation of root tissue. The protoplasts isolated by this method were remained healthy up to 4 hrs which is enough time to measure the cellular physiological activity. These results show that the two-step treatment of osmotic pressure was successful to obtain high yield of healthy protoplast from tomato root tissue.

Key words: protoplast, tomato roots, ATPase, osmotic treatment
*Corresponding author