

cAMP가 보리와 귀리잎 Protoplast의 팽윤에 미치는 영향

유장걸, 송필순, 문두길, 송성준

cAMP effect on swelling of etiolated barley and oat leaf protoplasts

Zang-Kual U., Pill-Soon Song, Doo-Kil Moon,
and Sung-Jun Song

Summary

The effect of cAMP on the swelling of protoplasts isolated from the primary leaves of etiolated barley and oat was studied.

The presence of 50ul dibutyryl cAMP caused protoplast swelling. The red light irradiation after adding dibutyryl cAMP enhanced the increase of protoplast size. It is likely that cAMP and phytochrome have common regulatory mechanism mediating protoplast swelling.

The protoplast swelling of oat and barley leaves was accelerated by GA₃ addition, indicating that cAMP, phytochrome and GA₃ were closely involved in protoplast swelling.

The electron microscopic pictures showed that red light irradiation made better plastid development in oat protoplasts and GA₃ addition increased the vacuole size.

서 론

cyclic-AMP (cAMP)는 많은 동물 호르몬 작용을 중간 매개하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(23,24).

동물의 간세포에서는 epinephrine 호르몬

의 자극에 의해 adenylyl cyclase가 활성화되어 cAMP 합성이 유기되고 합성된 cAMP가 다른 효소의 기능을 촉진시켜 glycogen을 분해한다(13).

이 외에도 동물에서는 cAMP가 자극호르몬의 종류에 따라 많은 특징적인 반응을 유도한

* 이 논문은 1985년 과학재단 차관연구비에 의하여 연구되었음.

다고 보고되어 있다 (13,26)

박테리아 또는 원핵 생물에서도 glucose 분해반응에 관여하는 효소들에 대한 cAMP 처리효과는 glucose 농도에 따라 상이하다는 보고도 있다 (2, 19). 이처럼 동물이나 원핵생물에서는 cAMP가 second messenger로서의 기능을 갖는다는 사실이 잘 알려져 있는 (8, 11, 24, 25, 30, 32) 반면에, 식물에서의 그 역할은 비교적 알려진 바가 적다.

그러나 식물에도 cAMP를 합성하는 효소인 adenylyl cyclase가 존재한다는 보고가 있으며 (1), 호밀의 endosperm 세포층의 cAMP 함량은 생체중 9당 2-12 pmol 정도 된다고 보고되어 있거만 (1), 이는 식물의 종류나 식물체 부위 또는 정량방법 (14) 등에 따라 큰 차이를 보이며 동물에 비해서는 훨씬 적은 값을 나타낸다.

최근 식물체내에서의 cAMP 기능에 대하여 연구된 바로는 보리 endosperm의 α -amylase, protease, acid phosphatase 활성에 관여 (21) 하고 종자의 발아 촉진 (16) 그리고 상치의 hypocotyl 신장과 세포벽 특성에 변화를 준다고 보고 (15) 되어 있다.

특히 개암나무의 cotyledon 내의 isocitrate lyase 활성이 cAMP 또는 GA에 의해 유도된다는 보고는 그 생리적인 기능이 유사하다는 가능성을 배제할 수 없게 한다.

또한 식물의 단세포 (Asparagus officinal)

에서도 bacteria처럼 glucose 농도가 탄소 대사에 관련된 효소 (glutamate dehydrogenase, acid phosphatase)의 활성에 영향을 주는 것으로 보아 cAMP가 glucose 분해반응에 대한 제어기능이 있다고 보고되었다 (28).

그리고 암조건에서 재배된 귀리에서 분리된 protoplast가 dibutyryl cAMP와 adenylyl cyclase의 활성제인 prostacyclin에 의해 팽윤된다는 보고도 있다 (17).

한편, Blakeley 등은 암조건에서 재배된 밀 잎의 protoplast가 phytochrome과 GA에 의해서 팽윤됨을 관찰한 바 있다 (4). 또한 암조건에서 재배된 완두잎 조직에 적색광을 처리하면 (^3H)-GA가 efflux 되고 (20) 담배 protoplast에서는 적색광이 GA 흡수를 저해한다고 보고했는데 (10), GA와 phytochrome 사이에 서로 밀접한 관계가 있음을 암시해 주는 것이다.

따라서 본 실험에서는 식물 protoplast에서 cAMP의 역할을 알아보기 위해 암조건에서 생육시킨 식물체 (보리, 귀리)에서 protoplast를 나출한 후 cAMP, dibutyryl cAMP, prostacyclin을 각각 처리하여 그 팽윤효과를 관찰하였고, 또한 여기에 적색광과 적외선광을 조사하여 phytochrome의 활성변화를 유기시키기에 따른 phytochrome과 이상에서의 생체 화합물에 의한 팽윤효과의 상승여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료의 준비

보리와 귀리종자 약 50 gr을 각각 1% 유한락스 용액에서 20분간 표면소독 한 뒤에 4시간 정도 수도물에 침지시킨 후 석영모래

가 담긴 그릇에 파종하고 상대습도 90%, 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 인 암상자에 넣고 안전광이 설치된 암실에서 6~8일간 생육시킨 다음에 시험재료로 이용하였다.

이때 사용된 영양액은 0.1% sucrose를 함유한 Murashige-Skoog 배지이었고 그 조성은 table 1과 같다.

Table 1. Composition of culture solution.

Macronutrients	per liter	Vitamins	per liter
NH ₄ NO ₃	1650 mg	Glycine	2
KNO ₃	1900 mg	Nicotinic acid	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440 mg	Pyridoxine -HCl	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370 mg	Thiamine -HCl	0.1
KH ₂ PO ₄	170 mg		
Micronutrients	per liter	Growth regulator	per liter
Na ₂ EDTA	37.25 mg	Kinetin	10.8 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.85 mg	IAA	10 mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3 mg		
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6 mg	Sugars	per liter
H ₃ BO ₃	6.2 mg	Sucrose	34.25 g
KI	0.83 mg	Myoinositol	100 mg
Na ₂ MnO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 mg		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025 mg		

2. 안전광 (Safety light) 설치

공시식물의 재배 및 protoplast 분리 등의 작업을 수행하기 위해서는 phytochrome의 광 흡수 영역이 아닌 500 nm 부근의 광원을 설치했는데 이것은 80W의 일반형광등 (33 cm × 129 cm) 에 몇 겹의 filter 를 사용해서 만들었다. filter 로는 초록색 및 청색 아크릴판 (두께 2.95 cm) 과 청색 및 초록색 셀로판 종이 (두께 0.05 cm) 를 모두 두 겹씩 덮고, 33 cm × 129 cm × 1.8 cm의 유리상자에 5%의 CuSO₄ 용액을 1 cm 깊이가 되도록 넣은 것을 추가시켜서 500 nm 부근 이외의 파장 (400 nm 영역과 600 - 700 nm 영역) 을 제거했다.

Spectronic-20 분광분석기의 PM tube 를 외부로 꺼낸 상태에서 500 nm 부근 이외의 광이 나오지 않는 것을 확인했으며 한 겹의 청색과 초록색의 아크릴판 및 CuSO₄ 용액의

단독 또는 함께 조합시켰을 때의 광흡수 spectrum 은 figure 1 과 같다.

3. Protoplast 분리

암조건에서 생육시킨 200 여 개의 보리 또는 귀리 잎의 상단부 1 cm 정도를 안전광 조건하에서 취하여 1% 유한락스로 표면을 살균을 한 뒤에 멸균증류수로 6 회 세척하였다. 그 후 보리잎을 면도날로 잘게 썰어 protoplast 분리용 효소용액 (table 2 참고) 20 ml 에 넣고 25°C에서 5 시간 동안 incubation 시켰다.

다시 이것을 4 겹의 가아제를 사용해서 찌꺼기를 걸러내고 이 용액을 x100 g 에서 1 분 동안 원심분리하여 효소용액을 제거하였다.

그런 다음 0.6M sorbitol, 50uM kinetin 을 함유하는 MS 배지용액 (pH 5.8) 을 이용하여 원심분리법으로 3 회 세척하였다.

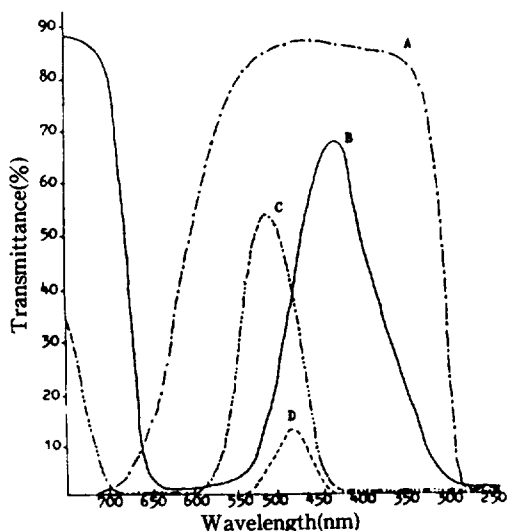


Figure 1. Absorption spectra of filters used for the safe light quality control.

- A : 5% W/V CuSO_4
- B: Green acryl C : Blue acryl
- D: Blue acryl+Green acryl+5%
W/V CuSO_4

Table 2. Enzyme mixtures used for protoplast isolation from barley and oat leaves.

Plant species	Enzyme mixtures
Barley	5 % W/V Cellulase-RS (Yacult Pharmaceutical Industry Co, Ltd, Japan) 0,25 % W/V Macerozyme-R10 (Yacult Pharmaceutical Industry Co, Ltd, Japan) 0,25 % W/V Hemicellulase (Sigma Chem, Co, USA) 0,6 M Sorbitol pH 6,8
Oat	2 % W/V Cellulysin (Calbiochem, CA) 0,2 % W/V Macerase (Calbiochem, CA) 0,5 % W/V BSA 5mM MES 0,6 M Sorbitol pH 5,8

이와 같이 하여 얻은 protoplast를 더욱더 순수 분리하기 위해 불연속적인 밀도차(discontinuous density gradient)를 갖는 0.6 M sucrose-sorbitol 용액을 가한 뒤에 x100 g에서 7분 동안 원심분리하였다. 원심분리한 뒤에 두 액층간에 떠있는 비교적 순수한 protoplast를 얻을 수 있었다. (12)

4. Protoplast viability 측정

아세톤에 fluorescein diacetate (FDA법) (18)을 5 mg/l 되도록 녹여 만든 용액에 protoplast suspension을 가하여 최종농도가 0.01% 되도록 한 뒤에 상온에서 5분동안 incubation 한 후, 형광장치가 부착된 도립 현미경(DIAPHOT, Nikon, Japan) 하에서 protoplast viability를 조사하였다. 살아있는 protoplast는 초록색의 진한 형광을 내기 때문에 관찰이 매우 용이하였다.

5. red 및 far red 광원

power supply unit로부터 전원을 공급받는 tungsten lamp(100V, 300W)를 광원으로 하고 lenz에 의해서 광을 집속시킨 뒤 interference type의 red filter(transmission range: 620-676 nm) 및 far red filter(transmission range: 701-744 nm)를 각각 사용함으로써 적색광과 적외선 광을 얻었다.

6. Protoplast 팽윤효과 실험

0.6 M sorbitol을 함유하는 MS 배지용액 ml당 5×10^5 개의 protoplast를 갖는 suspension 100 ul를 취하여 작은 유리용기에 넣어서 아래와 같이 여러가지 처리를 한 뒤 2시간 동안 4°C에서 incubation시키고 현미경 상에서 50개의 protoplast 직경을 측정 한 뒤 평균치와 표준오차를 계산하였다.

cAMP, dibutyryl cAMP 및 prostacyclin 처리효과를 보기 위한 실험내용은 다음과 같다.

가) cAMP와 phytochrome과의 상호작용 실험

control
cAMP (독일 serva co.)
cAMP + red light
cAMP + far red light

나) dibutyryl cAMP와 phytochrome과의 상호작용 실험

control
dibutyryl cAMP (미국 sigma chemical co.)
dibutyryl cAMP + red light
dibutyryl cAMP + far red light

다) prostacyclin과 phytochrome과의 상호작용 실험

control
prostacyclin (독일 serva co.)
prostacyclin + red light
prostacyclin + far red light

7. 전자현미경 촬영을 위한 oat protoplast 시료조제

여러가지 처리를 한 oat protoplast suspension에 table 3과 같은 용액을 1:2 비율로 첨가해서 2시간 동안 고정시켰다. 그후 10분 동안 원심분리하여 얻은 pellet를 0.5 - 1 mm³ 크기로 잘라서 parafilm에 옮기고 여기에 2% agar 한 방울을 가하여 건조시켰다. 그후 Na Cacodylate buffer (pH 5.8)로 3회 세척하고 ethanol-bezene 용액으로 탈수하여 spur resin과 무수알코올에 침투시킨 뒤 LKB-ultratome-3(LKB, Austria)로 잘라서 전자현미경(Hitachi, HU 11-E, Japan)으로 촬영하였다.

Table 3. Fixation solution for electron micrograph.

Fixation solution composition
3 % Glutaraldehyde
1 % Osmium tetroxide
0.6 M Sorbitol
Murashige-Skoog medium
pH 5.8

결과 및 고찰

1. 처리농도에 따른 cAMP 및 dibutyryl cAMP의 효과

cAMP와 dibutyryl cAMP 처리농도에 따른 팽윤효과를 관찰하기 위해 순수분리된 protoplast에 10, 20, 50, 100, 250 μ M cAMP와 dibutyryl cAMP를 각각 처리하여 얻은 결과는 table 4,5와 같다. 즉 cAMP와 dibutyryl cAMP 처리에 의한 protoplast 팽윤효과는 농도가 증가함에 따라 증가되었으며 50과 100 μ M에서 가장 높은 경향을 보였다.

Kim 등(17)은 귀리의 protoplast에서 50-100 μ M dibutyryl cAMP를 처리하여 팽윤효과를 관찰했으나 100 μ M cAMP에서는 팽윤효과가 없는 것으로 보고한 바 있다.

본 실험에서도 50-100 μ M dibutyryl cAMP가 보리의 protoplast를 팽윤시켰을 뿐만 아니라 cAMP 처리농도에 따른 팽윤효과도 관찰되어 이 점은 Kim 등(17)의 결과와 상이하다.

Table 4. Effect of cAMP concentration on the size of etiolated barley protoplasts.

Treatments*	Mean diameter μ m \pm SE**	Increase in diameter μ m \pm SE
Control	20.65 \pm 0.38	
10 μ M cAMP	21.57 \pm 0.45	0.92 \pm 0.59
20 μ M cAMP	22.07 \pm 0.41	1.42 \pm 0.56
50 μ M cAMP	22.65 \pm 0.43	2.00 \pm 0.57
100 μ M cAMP	23.06 \pm 0.48	2.41 \pm 0.61
250 μ M cAMP	22.62 \pm 0.46	1.97 \pm 0.60

* All treatments were given immediately after isolation of protoplasts and the size was measured after 2hr-incubation at 4 $^{\circ}$ C.

** The SE values refer to size distribution of 50 protoplasts counted.

Table 5. Effect of dibutyryl cAMP concentration on the size of etiolated barley protoplasts.

Treatments *	Mean diameter um \pm SE**	Increase in diameter um \pm SE
Control	21.40 \pm 0.42	
10 uM dBcAMP	22.40 \pm 0.49	1.00 \pm 0.65
20 uM dBcAMP	22.85 \pm 0.46	1.45 \pm 0.63
50 uM dBcAMP	24.26 \pm 0.43	2.86 \pm 0.60
100 uM dBcAMP	24.38 \pm 0.48	2.98 \pm 0.64
200 uM dBcAMP	24.15 \pm 0.35	2.75 \pm 0.55

* All treatments were given immediately after isolation of protoplasts and the size was measured after 2hr-incubation at 4°C.

** The SE values refer to size distribution of 50 protoplasts counted.

2. cAMP와 dibutyryl cAMP 처리 후의 배양시간에 따른 팽윤효과

cAMP와 dibutyryl cAMP를 보리의 protoplast에 처리하고 귀리에서는 dibutyryl cAMP만을 처리한 뒤 배양시간을 달리했을 때의 팽윤효과를 관찰하였다.

보리의 protoplast인 경우에는 적색광

처리에 의해서 관찰되었던 것(20)과 마찬가지로 cAMP와 dibutyryl cAMP 모두 2시간 후에 가장 팽윤효과가 컸고 그후에는 효과가 점차 감소되고 있었다 (table 6, 7) 한편, 귀리의 protoplast인 경우는 dibutyryl cAMP를 처리했을 때 48시간 후까지도 계속 증가하였다 (table 8).

Table 6. Effect of incubation time on the size and viability of etiolated barley protoplasts.

	Mean diameter um \pm SE			
	0hr	2hr	4hr	12hr
Control	22.03 \pm 0.29	21.57 \pm 0.26	21.24 \pm 0.27	21.69 \pm 0.28
50 uM cAMP		22.72 \pm 0.28	21.90 \pm 0.29	21.94 \pm 0.24
diameter (um)*		1.15	0.66	0.25
Viability (%)	89.6	86.4	83.7	79.8

* Protoplast size differences between control and cAMP treatments at each corresponding incubation time.

Table 7. Effect of incubation time on the size and viability of etiolated barley protoplasts.

	Mean diameter $\mu\text{m} \pm \text{SE}$			
	0hr	2hr	4hr	12hr
Control	21.35 \pm 0.23	22.30 \pm 0.28	22.49 \pm 0.22	22.23 \pm 0.29
50 μM dibutyryl cAMP		23.69 \pm 0.29	22.93 \pm 0.25	22.48 \pm 0.30
diameter (μm)*		1.39	0.44	0.25
Viability (%)	84.9	79.4	80.2	71.7

* Protoplast size differences between control and dibutyryl cAMP treatments at each corresponding incubation time.

Table 8. Effect of incubation time on the size of etiolated oat protoplast.

	Mean diameter $\mu\text{m} \pm \text{SE}$					
	0hr	2hr	4hr	12hr	24hr	48hr
Control	20.00 \pm 1.75	20.06 \pm 1.86	20.36 \pm 1.98	22.80 \pm 2.42	23.51 \pm 2.85	24.53 \pm 2.32
50 μM dibutyryl cAMP		21.25 \pm 1.30	22.23 \pm 1.77	33.27 \pm 2.63	33.66 \pm 2.84	35.96 \pm 2.22
diameter (μm)*		1.19	1.87	10.5	10.2	11.4

* Protoplast size differences between control and dibutyryl cAMP treatments at each corresponding incubation time.

3. cAMP 및 dibutyryl cAMP에 의한 팽윤효과 비교

cAMP와 그 유도체인 dibutyryl cAMP를 보리와 귀리의 protoplast에 처리하여 팽윤효과를 비교하여 보면 table 9에서 보는 바와 같이 보리에 비해 귀리에서 더 효과가 큰 것으로 나타났다. 또한 귀리와 보리 protoplast 모두 cAMP보다는 dibutyryl cAMP 처리에 의해서 그 팽윤효과가 더 크게 나타났다.

동물세포에서 cAMP가 직접 세포막을 투과하지 못한다고 알려진 바 있었지만 최근 Wiedmaier 등(31)은 cAMP를 식물잎에 처

리한 후 protoplast를 분리하여 cAMP 함량을 측정했을 때 세포내 cAMP 함량이 증가(농축계수 30)되는 것으로 보아 cAMP가 식물세포내로 들어갈 수 있다고 보고한 사실은 외부에서 처리했을 때에도 protoplast 팽윤효과가 유지될 수 있음을 강력히 뒷받침한다고 생각한다.

또한 dibutyryl cAMP보다 cAMP에 의한 팽윤효과가 줄어진 이유는 cAMP가 세포막을 투과할 때 그 표면에 존재하는 phosphodiesterase에 의한 분해(7)가 부분적으로 일어나기 때문에 dibutyryl cAMP를 처리했을 때보다 세포막으로 들어가는 양이 감소되어

Table 9. Effect of cAMP and dibutyryl cAMP on the size of etiolated oat-and-barley-leaf protoplasts.

Treatments*	Oat**		Barley***	
	Mean diameter um \pm SE****	Increase in diameter um \pm SE	Mean diameter um \pm SE	Increase in diameter um \pm SE
Control	24.53 \pm 2.32		21.40 \pm 0.42	
50 μ M cAMP	30.17 \pm 2.90	5.64 \pm 3.71	23.40 \pm 0.43	2.00 \pm 0.57
50 μ M dibutyryl cAMP	35.96 \pm 2.22	11.43 \pm 3.21	24.26 \pm 0.43	2.86 \pm 0.60

* All treatments were given immediately after isolation of protoplasts.

** The size of oat protoplast was measured after 48hr-incubation at 4°C.

*** The size of barley protoplast was measured after 2hr-incubation at 4°C.

**** The SE values refer to size distribution of 50 protoplasts counted.

팽윤효과가 적게 나타난 것으로 생각된다.

귀리의 protoplast 팽윤이 보리보다 훨씬 큰 이유는 본 실험결과로는 해석되지 않지만 공시한 귀리 품종이 phytochrome 생성능력이 다른 것에 비해 월등하다는 점으로 미루어 보아 phytochrome 작용계가 보리와는 다르기 때문인 것으로 사료된다.

4. 보리 protoplast 에서의 cAMP와 phytochrome 의 상호작용

cAMP와 dibutyryl cAMP의 상호작용을 알아보기 위해 암조건에서 생육된 보리잎에서 분리된 protoplast에 cAMP 또는 dibutyryl cAMP를 처리한 뒤에 적색광 또는 적외선광을 조사시켜 protoplast 팽윤효과를 조사해 본 결과 table 10, 11과 같다.

Table 10. Effect of cAMP and cAMP combined with light on the size of etiolated barley protoplasts.

Treatments*	Rep.	Mean diameter	Increase in	Significance group at 5%
		um \pm SE**	diameter um \pm SE	
Control	3	20.51 \pm 0.42		a
50 μ M cAMP	3	21.47 \pm 0.46	0.96 \pm 0.62	b
50 μ M cAMP+Red	3	21.81 \pm 0.41	1.30 \pm 0.59	b
50 μ M cAMP+Far red	3	20.51 \pm 0.48	0.00 \pm 0.48	a

* Red and far red irradiation was of 2 min duration and protoplast size was measured after 2hr-incubation at 4°C.

** The SE values refer to size distribution of 50 protoplasts counted.

Table 11. Effect of dibutyryl cAMP and dibutyryl cAMP combined with light on the size of etiolated barley protoplasts.

Treatments*	Rep.	Mean diameter um ± SE**	Increase in diameter um ± SE	Significance group at 5%
Control	3	21.36 ± 0.43		a
50 uM dBcAMP	3	22.50 ± 0.38	1.14 ± 0.57	b
50uM dBcAMP+Red	3	22.92 ± 0.43	1.56 ± 0.61	b
50uM dBcAMP+Far red	3	21.63 ± 0.38	0.27 ± 0.57	a

* Red and far red irradiation was of 2 min duration and protoplast size was measured after 2hr-incubation at 4°C.

** The SE values refer to size distribution of 50 protoplasts counted.

cAMP 또는 dibutyryl cAMP를 처리한 즉시 적색광을 조사하면 protoplast 팽윤이 상승됨을 관찰할 수 있었으나 반면에, 적색광 대신 적외선광을 조사시키면 cAMP 또는 dibutyryl cAMP 처리에 의한 팽윤효과도 소실되었음을 알 수 있었다.

한편, adenylyl cyclase의 활성제인 prostacyclin의 단독처리 경우 또는 적색광 및 적외선광 혼합처리 경우에 protoplast 팽윤

효과가 관찰되지 않았다 (table 12). 컰리의 protoplast에서 prostacyclin 처리가 팽윤효과가 있다고 보고한 Kim 등(17)의 결과와는 서로 일치하지 않고 있는데 본 실험에 공시된 prostacyclin을 구입할 당시 운송도중 액체탄산의 휘산으로 상온에 방치되어 변질되었을 우려가 있는 것으로 생각된다.

Table 12. Effect of prostacyclin and prostacyclin combined with light on the size of etiolated barley protoplasts.

Treatments*	Rep.	Mean diameter um ± SE**	Increase in diameter um ± SE	Significance group at 5%
Control	3	22.98 ± 0.52		a
50uM Prostacyclin	3	22.47 ± 0.46	-0.51 ± 0.69	a
50 uM Prostacyclin+Red	3	22.46 ± 0.57	-0.52 ± 0.77	a
50uM Prostacyclin + Far red	3	22.65 ± 0.47	-0.33 ± 0.62	a

* Red and Far red irradiation was of 2 min duration and protoplast size was measured after 2hr-incubation at 4°C.

** The SE values refer to size distribution of 50 protoplasts counted.

5. 식물생장조절 물질의 영향

사용한 몇 가지 식물생장조절 물질 (IAA, Kinetin, GA₃) 중에서 GA₃ 는 보리와 귀리에서 protoplast 를 팽윤시켰으나 Kinetin 은 귀리에서만, 그리고 IAA 는 전혀 팽윤효과가 없었다 (table 13).

이와 같은 결과는 토마토 등에서 IAA 에 의한 protoplast 크기가 커진다는 보고 (9) 와는 일치하지 않는데 이는 식물종에 따라 생장조절제의 영향이 다르게 나타나는 것이 아닌가 생각된다.

Table 13. Effect of kinetin, IAA and GA concentration of the size of etiolated oat and barley protoplasts.

Treatments*	Oat**		Barley***	
	Mean diameter um ± SE****	Increase in diameter um ± SE	Mean diameter um ± SE	Increase in diameter um ± SE
Control	28.33 ± 2.78		22.60 ± 0.40	
50uM Kinetin	33.05 ± 2.01	4.72 ± 3.43	22.58 ± 0.61	-0.04 ± 0.73
10uM IAA	30.88 ± 3.88	2.55 ± 4.72	22.99 ± 0.45	0.37 ± 0.60
50uM GA	32.37 ± 3.72	4.04 ± 4.64	24.13 ± 0.47	1.72 ± 0.62

* All treatments were given immediately after isolation of protoplasts.

** The size of oat protoplast was measured after 48hr-incubation at 4°C.

*** The size of barley protoplast was measured after 2hr-incubation at 4°C.

**** The SE values refer to size distribution of 50 protoplasts counted

6. protoplast 의 전자현미경 촬영

귀리의 protoplast 를 적색광, 적외선광, GA₃ 을 처리하여 4°C 에서 배양한 뒤에 전자현미경 촬영을 해본 결과 figure 2, 3, 4, 5 와 같다.

적색광 조사는 암조건의 경우보다 plastid 발달이 현저하였고 GA₃ 처리에서는 액포가 크게 확대되었음을 볼 수 있었다.

한편, 적외선광 처리에서는 적색광 처리보다 plastid 수가 적은 것을 관찰할 수 있었는데, 이상의 광처리 및 GA₃ 처리가 전자현미경 수준에서 어떤 영향을 주는가에 대해서는 조건을 다양하게 설정하여 다각적인 검토를 더 해 보아야 해명될 수 있을 것이라고 생각된다.

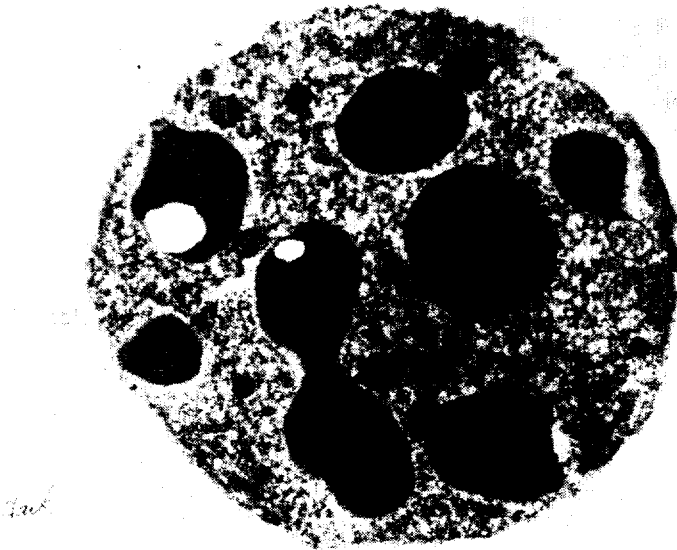


Plate 1. Electron micrograph of the etiolated Oat protoplast (14,000 X)

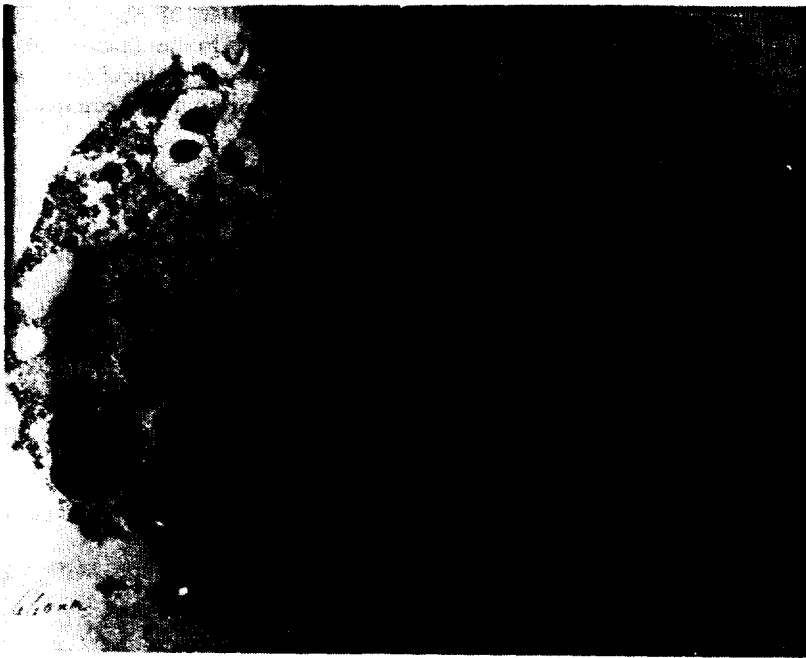


Plate 2. Electron micrograph of the etiolated Oat protoplast (14,000 X) treated with red light.



Plate 3. Electron micrograph of the etiolated oat protoplast (14,000 \times) treated with far red.



Plate 4. Electron micrograph of the etiolated oat protoplast (14,000 \times) treated with GA₃.

적 요

암조건에서 생육시킨 보리 (barley) 와 귀리 (oat) 잎의 상단부에서 분리한 protoplasts 는 dibutyryl cAMP 처리에 의해서 팽윤되었으며 또한, 적색광과 cAMP 혼합처리에 의해서 protoplasts 팽윤효과가 상승되었다.

따라서 phytochrome 작용계와 cAMP는 일련의 공통기능을 갖고 있는 것으로 사료되며,

GA₃ 처리에 의해서도 보리와 귀리의 protoplasts 가 팽윤되므로 GA₃ 와 cAMP 그리고 phytochrome 작용계가 서로 연류되어 있을 가능성이 있다고 생각된다.

한편, 적색광을 조사하거나 GA₃ 를 처리한 후 전자현미경사진을 촬영해 봤을 때, 적색광 처리에서는 plastid 발달이, GA₃ 처리에서는 액포발달이 현저하였다.

참 고 문 헌

1. Ashton, A. R., and G. M. Polya. 1978. Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in axenic rye grass endosperm cell cultures. *Plant physiol.* 61: 718-722.
2. Beck, C., and H. K. von Meyenberg. 1968. Enzyme pattern and aerobic growth of *saccharomyces cerevisiae* under various degree of glucose limitation. *J. Bacteriol.* 96:479-486.
3. Beevers, L., B. Loveys, J. A. Pearson, and P. F. Wareing. 1970. Phytochrome and hormonal control of expansion and greening of etiolated wheat leaves. *Planta (Berl.)* 90:286-294.
4. Blakeley, S. D., B. Thomas, J. L. Hall, and D. Vince-Prue. 1983. Regulation of swelling of etiolated-wheat-leaf protoplasts by phytochrome and gibberellic acid. *Planta* 158:416-421.
5. Bressan, R. A., A. K. Handa, H. Quader, and P. Filner. 1980. Synthesis and release of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate by *Ochromonas malhamensis*. *Plant Physiol.* 65: 165-170.
6. Bressan, R. A., and C. W. Ross. 1976. Attempts to detect cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in higher plants by three assay methods. *Plant. Physiol.* 57:29-37.
7. Brewin, N. J., and Northcote, D. H. 1973. Partial purification of a cyclic AMP phosphodiesterase from soybean callus. Isolation of a non-dialysable inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* 320:104-122.
8. Brown, E. G., and Newton, R. P. 1981. Cyclic AMP and higher plants. *Phytochemistry* 20:2453-2463.
9. Cocking, E. C. 1976. Growth substances and protoplasts. In "Plant growth regulation" (edited by P. E. Pilet). *Proc. 9th. Int. Con. on plant growth substances.* pp.281-284.
10. Dale Keppler, L., and D. Mertz. 1986. Effect of phytochrome on the uptake of gibberellin by protoplasts of *Nicotiana glutinosa* L. *Plant Cell Physiol* 27(5):861-865.
11. de Crombrugge, B., S. Busby, and H. Buc. 1984. Cyclic AMP receptor protein: Role in transcription acti-

- vation. *Science*, 224:831-838.
12. Edwards, G. E., S. P. Robinson, N. J. C. Tyler, and D. A. Walker. 1978. Photosynthesis by isolated protoplasts, protoplast extracts, and chloroplasts of wheat, *Plant Physiol.* 62:313-319.
 13. Giese, C. 1979. *Cell physiology*. W. B. Saunders Co. USA, pp.364-368.
 14. Handa, A. V., and M. M. Johri. 1977. Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in moss protonema. *Plant Physiol.* 59:490-496.
 15. Kamisaka, S., H. Sano, M. Katsumi, Y. Masuda. 1972. Effects of cyclic AMP and gibberellic acid on lettuce hypocotyl elongation and mechanical properties of its cell wall. *Plant & Cell Physiol.* 13:167-173.
 16. Kamisaka, S., and Y. Masuda. 1971. Stimulation of gibberellin induced germination in lettuce seeds by cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate. *Plant & Cell Physiol.* 12:1003-1005.
 17. Kim, Y. S., D. K. Moon, J. R. Goodin, and P. S. Song. 1986. Swelling of etiolated oat protoplasts induced by cAMP and red light. *Plant Cell & Physiol.*
 18. Larkin, P. J. 1976. Purification and viability determination of plant protoplasts, *Planta (Berl.)* 128:213-216.
 19. Magasanik, B. 1961. Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26:249-257.
 20. Mertz, D. 1985. Effect of phytochrome on uptake and efflux of gibberellin. *Plant Cell Physiol.* 26:701-707-
 21. Nickells, M. W., G. M. Schaefer, and A. G. Galsky. 1971. The action of cyclic-AMP on GA₃ controlled responses I. Induction of barley endosperm protease and acid phosphatase activity by cyclic-3', 5'-adenosine monophosphate. *Plant & Cell Physiol.* 12:717-725.
 22. Pinfield, N. J. 1969. The promotion of isocitrate lyase activity in hazel cotyledons by exogenous gibberellin. *Planta* 82:20-24.
 23. Robinson, G. A., R. W. Butcher, and E. W. Sutherland. 1968. cyclic-AMP. *Ann. Rev. Biochem.* 37:149-174.
 24. Ross, C. W. 1981. Biosynthesis of nucleotide. In "The Biosynthesis of Plants" (edited by P. K. Stumpf and E. E. Conn), Press, New York. pp.169-205.
 25. Rutherford, C. L., R. L. Vaughan, M. J. Cloutier, D. K. Ferris, and D. A. Brickey. 1984. Chromatographic behavior of cyclic AMP dependent protein kinase and its subunits from *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry.* 23:4611-4617.
 26. Sutherland, E. W. 1971. Studies on the mechanism of hormone action In "Papers in Biochemistry" (edited by J. Herriott, G. Jacobson, J. Marmur, and W. Parson). Addison-Wesley Pub. Co. pp.588-605.
 27. Sutherland, E. W., and T. W. Rall. 1962. The relation of adenosine 3', 5'-phosphate and phosphorylase to

- the action of catecholamines and Other hormones. *Pharmacol. Rev.* 12:265-299.
28. Tassi, F., F. M. Restivo, P. P. Puglisi, and G. Cacco. 1984. Effect of glucose on glutamate dehydrogenase and acid phosphate and its reversal by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in single cell cultures of *asparagus officinalis*. *Plant Physiol.* 60:61-64.
29. U. Z. K., P. S. Song, D. K. Moon, S. J. Song, and K. A. Hong. 1986. Phytochrome effect on swelling of etiolated barley leaf protoplasts. *Cheju App. Rad. Res. Inst. Ann. Report.* 2:55-62.
30. Wasternack, C. 1982. Metabolism of pyrimidines and purines. In "Encyclopedia of Plant Physiology" New Ser. Vol. 14B: Nucleic acids and Proteins in Plants II (edited by B. Parhhier and D. Boulter), Springer-Verlag, Berlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp.263-301.
31. Wiedmaier, J., and Kull, U. 1976. Evidence of cyclic-AMP uptake into plant cells. *Naturwissenschaften* 63:147.
32. Wilson, R. H., and R. J. Graesser. 1976. Ion transport in plant mitochondria. In "Encyclopedia of Plant Physiology" New Ser. Vol. 3 (edited by G. R. Stocking and U. Heber), Springer-Vereag, Berlin, Heidelberg, New York, pp.377-397.