

Cymbidium spp.의 Protocorm 묘조 분화시 Protocorm내 전분 함량에 미치는 GA₃와 ABA의 영향

韓泰鎭·康榮燾*·金應植*
(한림대학교 생물학과·연세대학교 생물학과)

Effects of GA₃ and ABA on Endogenous Starch Content during Shoot Differentiation in *Cymbidium* spp. Protocorm

Han, Tae-Jin, Young Hee Kang and Eung Sik Kim*

(Department of Biology, Hallym University, Choonchun and *Department of Biology,
Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

Changes in starch content and activities of ADPG- and UDPG-starch synthase and α - and β -amylase were studied in order to investigate effects of gibberellic acid and abscisic acid on endogenous starch content during shoot differentiation and protocorm propagation in *Cymbidium* spp. (Jungfrau) protocorm.

Shoot differentiation was promoted during the degradation of endogenous starch and protocorm propagation was promoted during starch accumulation in protocorm. The activities of ADPG- and UDPG-starch synthase and α - and β -amylase seemed to be related with starch content. Shoot differentiation and protocorm propagation were slightly inhibited in protocorm explants treated with 100 μ M gibberellic acid. The explants treated with 10 μ M abscisic acid lost the capacity for shoot differentiation and protocorm propagation, and that could not be overcome by 100 μ M gibberellic acid added to culture medium.

Starch content fluctuated as the control even after 10 μ M abscisic acid. None the less, the treatment completely inhibited shoot differentiation and protocorm propagation.

서 론

담배 묘조 분화 callus에는 전분이 다량 축적되고 심하게 액포화된 유조직이 있는데 (Thorpe and Murashige, 1970) 묘조 분화 직전에 전분 함량이 최대로 되었다가 (Thorpe and Meier, 1972) 묘조가 분화함에 따라 전분과 액포는 감소된다 (Ross *et al.*, 1973). *Cymbidium*의

본 논문은 1987년 한림대학 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

protocorm 도 그 중심부에 전분이 축적된 유조직이 있는데 (Nagl *et al.*, 1972) 이것은 묘조 분화 callus와 유사하다 (Wetmore and Rier, 1963). Thorpe (1980)는 이 전분이 묘조 분화시 energy와 탄소 골격을 공급하며 (Thorpe, 1982), 삼투조절제 (Brown *et al.*, 1979)로도 사용된다고 하였다.

담배의 묘조 분화 callus는 비분화 callus에 비하여 전분 합성 효소인 starch synthase와 Q-enzyme의 활성은 거의 전과정에서 높고 전분 분해 효소인 R-enzyme과 α -amylase의 활성은 묘조가 분화되는 배양 후기에만 증가하므로 (Thorpe and Meier, 1974), 묘조 분화에 따른 전분 함량 변화에는 이들 효소가 관여함을 알 수 있다.

과량의 gibberellic acid (GA_3 , 10 mg/l)는 담배 callus 배양시 starch synthase의 합성은 억제하고 α -amylase합성은 촉진하여 (Sasaki and Kainuma, 1984) 전분 합성을 억제하며 (Thorpe *et al.*, 1986) 묘조 분화도 억제하는데 (Murashige, 1961), *Cymbidium*의 경우도 이와 유사하여 protocorm의 증식과 분화를 억제하며 분화된 잎을 황백화시킨다 (Fonneshech, 1972). 한편, abscisic acid (ABA)는 α -amylase의 합성 (Tittle and Spencer, 1986)과 묘조 분화를 억제하며 (Barros and Neill, 1987; Douglas, 1985), 배발생을 촉진한다 (Raiasekaran *et al.*, 1987). 이처럼 GA_3 와 ABA는 조직내 전분 함량과 분화에 관여하므로 *Cymbidium* protocorm의 증식과 묘조 분화에도 영향을 미칠 것으로 추정된다.

*Cymbidium*의 protocorm은 그 증식과 분화양상 및 해부학적 특징이 callus와 유사하고 증식과 묘조 분화도 용이하다. 따라서 본 실험은 이러한 protocorm의 특성을 이용하며 묘조 분화와 protocorm내 전분 함량과의 관계성을 밝히고자 GA_3 와 ABA의 영향을 상호 비교하였다.

재료 및 방법

Protocorm의 유기 및 배양. *Cymbidium* spp. for. 'Jungfrau'를 Lindeman 등 (1970)과 Churchill 등 (1971)의 방법을 변용하여 1 μ M naphthalene acetic acid와 0.1 μ M benzyladenine 으로 조성한 MS 고형 배지로 인공 환경 조절 장치 (Percival)에서 protocorm을 유기, 배양, 증식시킨 다음, 세절하여 생장 hormone이 첨가되지 않는 MS 액체 기본 배지로 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 120 rpm, 암소의 향온 진탕배양기 (Kuk Je)에서 20일 간격으로 3회 진탕 배양하여 hormone 전력을 없앤 후 실험 재료로 사용하였다.

실험구의 설정. Hormone이 첨가되지 않는 MS 액체 기본 배지를 대조구로 하여 실험구는 100 μ M GA_3 처리구, 10 μ M ABA 처리구 및 100 μ M GA_3 와 10 μ M ABA의 혼합 처리구로 설정하였다. GA_3 와 ABA의 배지내 첨가는 0.22 μ M 세균 여과기를 사용하였으며, 암소의 향온 진탕 배양기에서 배양하였다. 각 실험 과정은 필요한 경우 4 $^{\circ}$ C 이하에서 수행하였다.

전분의 추출과 전량. Protocorm으로부터 전분의 추출, 정제 및 정량은 Mangat 등 (1985)과 Robyt와 Bemis (1967)의 방법에 따라 phenol-sulfuric acid법으로 분광 광도계 (Beckman DU 8B)로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 전분 함량을 측정하였다.

Starch synthase 활성도 측정. ADPG, UDPG-starch synthase의 효소 추출과 활성도 측정 은 Ou-Lee와 Setter (1985) 및 MacDonald와 Preiss (1983)의 방법을 수정하여 사용하였다. 반응액은 ADP-glucose나 UDP-glucose가 각각 1 mM이 되도록 조성하였고, ADP-D-[U- 14 C] glucose (25 cpm/nmol)와 UDP-D-[U- 14 C] glucose (25 cpm/nmol)는 0.2 μ Ci/ml로 조정하였다.

효소의 활성 측정은 효소 반응을 정지시킨 후, glass microfibre filter (GF/B, 4.7cm)로 여과하여 세척하여 5-10 mg의 thixotropic gelatinizing powder (Packard)가 든 (Ou-Lee and Setter, 1985) 10 ml toluene/Triton X-100 (2:1) scintillation cocktail용액에 넣어 (Setter and Meller, 1984) scintillation counter (Packard Tricarb 4530)로 방사능을 측정하여 효소 활성을 구하였다.

Amylase 활성도 측정. α , β -amylase 효소 추출과 활성도 측정은 Okamoto와 Akazawa (1979)의 방법을 수정하여 사용하였으며 효소 활성은 Bernfeld (1955)의 방법에 따라 분광 광도계 (Beckman DU 8B)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 구하였다.

단백질 함량은 Lowry 등 (1951)의 방법으로 측정하였다.

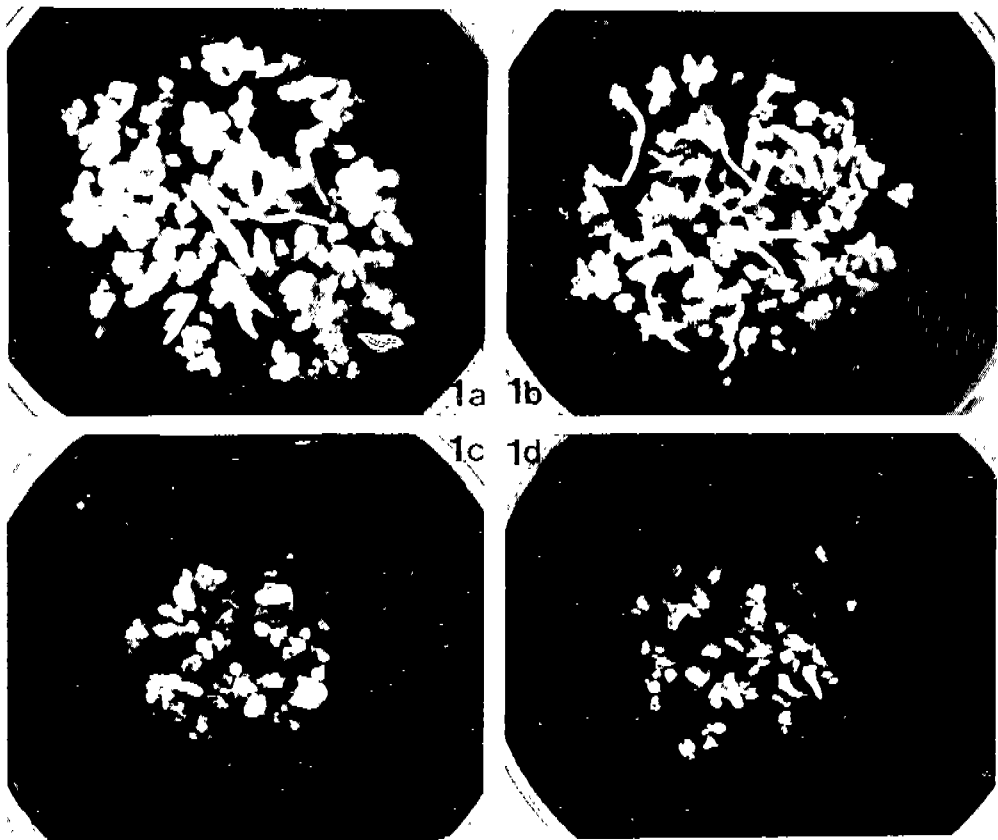


Fig. 1. Appearance of *Cymbidium* spp. protocorm after 20 days in liquid culture in the dark. (1a) Protocorm on control throughout the culture period. Note the protocorm propagation and shoot differentiation at high levels. (1b) Protocorm on 100 μ M GA₃ medium throughout the culture period. Note the protocorm propagation and shoot differentiation at lower levels. (1c, 1d) Protocorm on 10 μ M ABA medium (1c), and mixture of 100 μ M GA₃ and 10 μ M ABA (1d) throughout the culture period. Note the inhibition of protocorm propagation and shoot differentiation and protocorm is quite necrotic.

결 과

형태 변화. 100 μ M GA₃와 10 μ M ABA의 단독 처리 및 100 μ M GA₃와 10 μ M ABA의 혼합 처리가 protocorm의 증식, 묘조 분화 및 묘조 성장에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 외부 형태 변화를 경시적으로 관찰하였다 (Fig. 1). MS 기본 배지에 hormone을 첨가하지 않는 대조구에서 protocorm의 증식 및 묘조의 분화와 성장이 가장 왕성하였는데, 배양 10일을 전후하여 묘조가 분화되었으며 그 이후는 묘조의 성장과 함께 새로운 protocorm의 증식이 왕성하였다 (Fig. 1a). GA₃ 처리구는 대조구와 유사하게 배양 10일을 전후하여 묘조가 분화되었다. 그리고 배양일이 경과됨에 따라 묘조는 대조구에 비하여 성장 속도는 빨랐으나 세장하였으며 새로 형성되는 protocorm은 그 크기도 작았고 증식 정도도 낮았다 (Fig. 1b). 한편, ABA 단독 처리구 (Fig. 1c) 및 GA₃와 ABA의 혼합 처리구 (Fig. 1d)는 배양 20일이 경과하여도 묘조의 분화가 극히 억제되었다. 또 배양 경과에 따라 심한 necrosis가 수반되었으며, protocorm의 증식도 극히 낮았다.

전분 함량의 변화. Protocorm내 전분 함량 변화는 GA₃ 처리구가 다른 실험구에 비하여 다른 경향을 나타내었다 (Fig. 2). 배양 초기인 처음 5일은 각 처리구 모두 전분 함량이 감소하였는데, GA₃ 처리구가 약 52% 감소로 가장 감소량이 컸으며, 그 다음이 GA₃와 ABA 혼합 처리구, GA₃ 처리구 순으로 감소하여, 대조구는 약 16%로 감소폭이 가장 적었다. 대조구의 전분 함량 변화는 15일까지 계속 완만히 감소하다가 20일에는 급격히 증가한데 비하여, GA₃ 처리구는 배양 5일에 급격히 감소한 후, 배양 10일에 비교적 상당량 증가하였다가 그 후에는 완만히 감소하였다. 한편, ABA 처리구와 GA₃와 ABA 혼합 처리구는 배양 10일에는 거의 변화가 없었다.

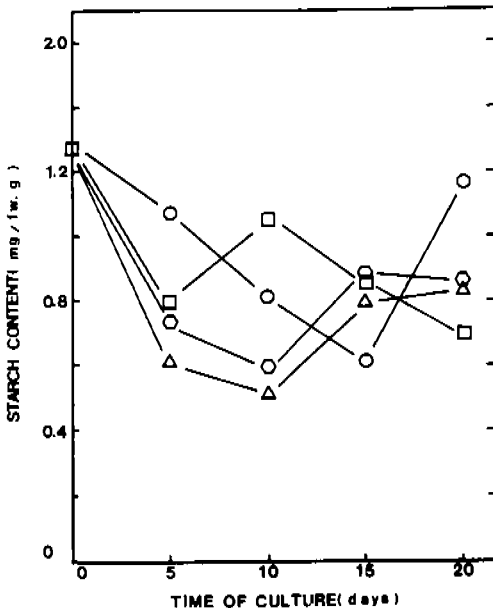


Fig. 2. The effects of 100 μ M GA₃ and 10 μ M ABA on starch content in *Cymbidium* spp. protocorm during shoot differentiation. Control, ○; GA₃, □; ABA, △; GA₃ + ABA, ◇.

효소의 활성 변화. 배양일 경과에 따른 protocorm내 ADPG, UDPG-starch synthase 및 α , β -amylase활성에 미치는 GA₃와 ABA의 영향을 조사하였다. 대조구의 경우 (Fig. 3), 배양 10일까지는 대체로 ADPG-starch synthase와 UDPG-starch synthase의 활성이 완만히 증가하였으나, 배양 15일에는 두 효소 모두 다소 활성이 감소하였다. 배양 15일까지 UDPG-starch synthase보다 ADPG-starch synthase의 활성이 다소 높았으나, 20일 경과 후에는 ADPG-starch synthase활성은 급격히 증가하였다.

한편, α -amylase와 β -amylase의 활성은 배양 15일까지 starch synthase보다 증가폭이 컸으나 20일 이후 다소 감소하였는데, 전반적으로 β -amylase의 활성이 α -amylase보다 높았다.

1) GA₃의 영향. GA₃처리구에서는 ADPG-starch synthase와 β -amylase의 활성 변화 양상이 유사하였다 (Fig. 4). ADPG-starch synthase와 UDPG-starch synthase의 활성은 각각 배양 10일과 15일에 가장 높아져 88%와 104%까지 급격히 증가하였다. ADPG-starch synthase활성은 배양 15일에 급격히 감소하였으며, 20일에는 현저히 증가하다가 20일에 다소 감소하는 경향을 보였고, β -amylase활성은 배양 10일에 100%까지 급격히 증가한 후, 역시 급격히 감소하였다.

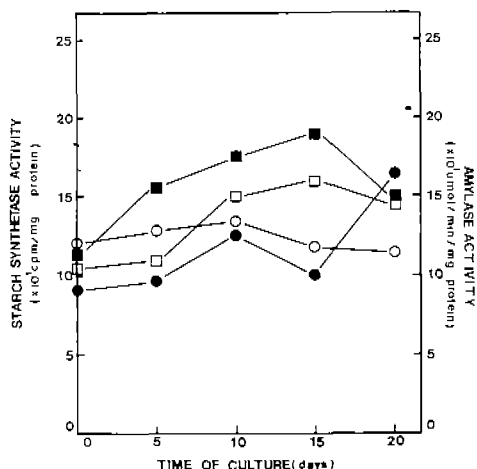


Fig. 3. The activities of starch synthase and amylase on control in *Cymbidium* spp. protocorm during shoot differentiation. ADPG-starch synthase, ○; UDPG-starch synthase, ●; α -amylase, ◐; β -amylase, ◑.

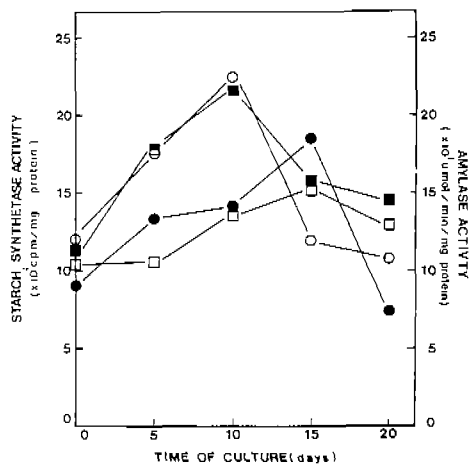


Fig. 4. The effects of 100 μ M GA₃ on starch synthase and amylase activities in *Cymbidium* spp. protocorm during shoot differentiation. ADPG-starch synthase, ○; UDPG-starch synthase, ●; α -amylase, ◐; β -amylase, ◑.

2) ABA의 영향. ABA 처리구에서는 전분 합성 효소인 ADPG-starch synthase와 UDPG-starch synthase는 활성 변화 양상이 유사하였으며, 전분 분해 효소인 α -amylase와 β -amylase도 활성 변화 양상이 유사하였다 (Fig. 5). ADPG-starch synthase 활성은 배양 15일 까지 큰 변화가 없다가 배양 20일에 다소 증가하였으며, UDPG-starch synthase는 배양 10일까지 완만히 증가한 후, 큰 변화가 없었다. α -amylase와 β -amylase 활성은 큰 변화가 없었던 반면, β -amylase는 비교적 큰 폭으로 감소하였다.

3) GA₃와 ABA혼합 처리의 영향. GA₃와 ABA 혼합 처리구의 효소 활성 변화는 두 종류 효소 모두 다소 증가후 감소되었다(Fig. 6). ADPG-starch synthase와 UDPG-starch synthase 중 ADPG-starch synthase활성은 배양 5일에 59% 증가한 후, 배양 20일에는 다소 감소하였다. 한편, α -amylase와 β -amylase의 활성은 배양 10일까지 급격히 증가하여 각각 93%와 78% 증가하였으나 α -amylase는 15일까지 큰 변화가 없다가 다소 감소한 반면, β -amylase는 배양 10일후 급격히 감소한 이후에 큰 변화가 없었다.

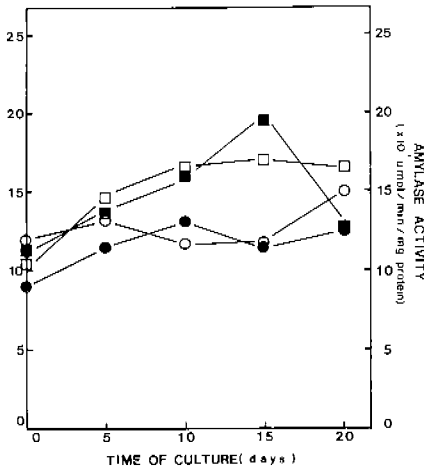


Fig. 5. The effects of 10 μ M ABA on starch synthase and amylase activities in *Cymbidium* spp. during shoot differentiation. ADPG-starch synthase, ○; UDPG-starch synthase, ●; α -amylase, ◻; β -amylase, ■.

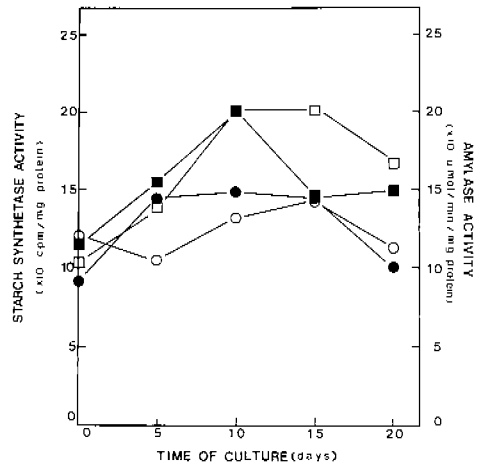


Fig. 6. The effects of mixture of 100 μ M GA₃ and 10 μ M ABA on starch synthase and amylase activities in *Cymbidium* spp. protocorm during shoot differentiation. ADPG-starch synthase, ○; UDPG-starch synthase, ●; α -amylase, ◻; β -amylase, ■.

고 찰

Callus는 묘조 분화 직전에 조직 내부에 전분이 다량 축적되지만 묘조의 분화와 발달과 함께 전분은 감소하는데 (Thorpe, 1982), *Cymbidium*의 protocorm도 이와 유사한 양상을 나타낸다 (Arditti, 1979). 비록 묘조 분화가 곧 전분 축적의 결과라고 보기는 어렵지만, 묘조의 분화는 이러한 전분의 합성과 분해와 밀접한 관련이 있다 (Thorpe, 1980). 따라서 전분의 합성과 분해는 묘조 분화와 발달의 한 원인이 되므로 전분의 합성과 분해의 조절은 곧 일련의 묘조 분화 기구의 한 부분이라고 할 수 있다.

감자의 괴경 (Obata-Sasamoto and Suzuki, 1979), 옥수수 (Boyer and Preiss, 1979; MacDonald and Preiss, 1983, 1985)와 벼 (Akazawa *et al.*, 1964; Tanaka *et al.*, 1967)의 배유와 같이 동화조직이 아닌 저장조직의 starch synthase는 많은 양이 전분립과 결합되어 있다. 또한 amylase도 전분립과 결합되어 있는 것 (Tanaka *et al.*, 1987)이 많은 것으로 알려져 있다. 그러나 본 실험에서는 수용성의 효소들만 조사하였는데, 이것은 묘조 분화시의 전분은 엽록체의 전분처럼 그 합성과 분해가 용이한데 착안한 것이다 (Harrison, 1977). 일반적으로 전분 합성의 주효소는 ADPG-starch synthase인 것으로 알려져 있으나 (Preiss and Levi, 1980), Sasaki와 Kainuma (1980)의 실험 결과를 토대로 ADPG-와 UDPG-starch synthase 두 종류 모두를 조사하였는데, *Cymbidium*의 protocorm 묘조 분화시에는 UDPG-starch synthase가 더 유효한 것으로 나타났다.

GA₃ 처리구의 경우 담배 callus에서는 묘조가 분화되지 않은 것과는 달리 (Murashige, 1961), Fomesbech (1972)의 실험 결과처럼 대조구 (Fig. 1a)보다는 낮지만 묘조 분화와 함께 protocorm도 증식되었는데 (Fig. 1b), 이것은 callus와는 달리 재료로 사용한 protocorm 자체에 존재하던 전분과 배양 초기의 일시적인 전분 함량증가 (Fig. 2)와 관련이 있다고 추정된다. 한편, Fig. 2의 전분 함량 변화에서 보는 것처럼 묘조 분화와 protocorm 증식은 대조구와 GA₃ 처리구에서는 비교적 왕성하였던 것과는 달리, ABA 단독 처리구 (Fig. 1c) 및 GA₃와 ABA 혼합 처리구 (Fig. 1d)에서는 극히 저조하였는데, 이러한 전분 함량의 변화는 관계 효소인 ADPG, UDPG-starch synthase 및 α , β -amylase의 활성 변화에 의해 뒷받침 된다 (Figs. 5 and 6). 따라서 전분 합성 효소인 starch synthase 생성은 억제하고 (Sasaki and Kainuma, 1984), 전분 분해 효소인 amylase의 생성은 촉진한다 (Leung and Thorpe, 1985; Tittle and Spencer, 1986)는 사실과 함께 전분 함량 변화가 protocorm의 증식과 묘조 분화 및 발달과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

*Phaseolus*의 callus (Abou-Mandour and Hartung, 1980)나, *Hyacinth*의 인편 (Pierik and Steegmans, 1975) 및 버드나무의 줄기 절편 (Barros and Neil, 1987)에 ABA를 처리하면 묘조 분화가 억제되었다. ABA를 처리한 protocorm도 묘조의 분화와 발달 및 증식이 대조구 (Fig. 1a)에 비하여 심하게 억제되었는데 (Fig. 1c), 이것은 protocorm내 전분 함량이 크게 감소되었기 때문인 것 (Fig. 2)으로 추정된다. GA₃와 ABA 혼합 처리구는 ABA 단독 처리구와 마찬가지로 protocorm의 증식 및 묘조의 분화와 발달이 심하게 억제되었는데 (Fig. 1d), amylase 합성은 억제한 반면 starch synthase의 합성은 촉진하여 전분 함량은 전과정에서 GA₃와 ABA의 혼합 처리구가 GA₃ 단독 처리구에 비하여 다소 높았으나 (Fig. 2), 변화 양상은 ABA 단독 처리구와 유사하게 나타났다.

한편, 효소의 활성 변화는 특히 배양 20일경에 ADPG, UDPG-starch synthase 활성이 큰 차이를 나타냈는데, ABA 단독 처리구에서는 활성이 증가한 것 (Fig. 5)에 반하여 GA₃와 ABA 혼합 처리구에서는 급격히 감소하였다 (Fig. 6). 일반적으로 전분의 합성은 auxin 특히 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid의 양이 증가하거나 (Deacon and Rutherford, 1972; Mangat, 1985; Misra *et al.*, 1975) GA₃의 양이 증가할 때도 감소하는데, 이것은 amylase의 증가에 의한 것이라기보다는 starch synthase의 합성 억제 때문인 것으로 알려져 있다 (Sasaki and Kainuma, 1984). 또한 amylase의 합성에 관한 GA₃와 ABA의 역할은 잘 알려져 있는 것 (Jacobsen and Chandler, 1987)처럼 GA₃는 amylase의 합성을 촉진하나 ABA는 억제하는데, GA₃와 ABA를 혼합 처리하는 경우 GA₃는 ABA의 amylase 합성 억제 효과를 다소 완화하기는 하나 그 효과가 매우 적다. 따라서 GA₃ 단독 처리구 및 GA₃와 ABA의 혼합 처리구 모두에서 배양 20일에 나타난 결과 즉, 상당량의 전분 함유 (Fig. 2)에도 불구하고 protocorm의 증식, 묘조의 분화 및 발달이 현저히 억제되고 necrosis 현상 (Figs. 1c, 1d)이 일어난 것은 starch synthase와 amylase 활성 변화 양상 (Figs. 5 and 6)이 대조구 (Fig. 3)와 유사함을 고려하여 볼 때, 전분 함량 감소와는 별개의 ABA에 의한 또 다른 묘조 분화 억제 작용이 있을 것으로 추정된다.

이상에서 살펴 본 것과 같이 protocorm 내 전분 함량 변화는 protocorm의 증식과 묘조 분화를 유도하는 선행 조건이기는 하나, 이와는 별도의 protocorm 증식과 묘조 분화를 좌우하는 또 다른 기작이 있음을 추정할 수 있었다.

적 요

Cymbidium spp.의 protocorm 묘조 분화시 protocorm 내 전분 함량 변화에 미치는 GA₃와 ABA의 영향을 알아 보기 위하여 형태 관찰과 함께 protocorm내 전분 함량과 ADPG, UDPG-starch synthase 및 α , β -amylase의 활성 변화를 조사하였다.

외부 형태적으로 100 μ M GA₃ 처리구는 대조구에 비하여 protocorm의 증식 및 묘조의 분화와 성장이 저조하였으나 묘조가 분화된 것은 더 세장되었으며, 10 μ M ABA 단독 처리구 및 100 μ M GA₃와 10 μ M ABA 혼합 처리구는 protocorm의 증식이나 묘조의 분화와 성장이 모두 매우 저조하였다. protocorm 내 전분이 분해될 때 묘조가 분화되었으며 전분 축적시에는 protocorm이 증식되었다. GA₃ 단독 처리구는 다소 묘조의 분화와 protocorm의 증식이 억제되었으며, ABA 단독 처리구와 GA₃와 ABA 혼합 처리구는 현저히 억제되었다. 한편, ADPG, UDPG-starch synthase와 α , β -amylase의 활성 변화는 전분 함량 변화와 상응하였는데, 특히, 배양 후기의 starch synthase의 활성은 ABA 단독 처리구는 감소한 반면, GA₃와 ABA 혼합 처리구는 증가하였다. 따라서 이상의 결과에서 *Cymbidium* protocorm의 증식과 묘조 분화는 protocorm내 전분 함량과 이에 관련된 starch synthase와 amylase의 활성 변화에 영향을 받으며, 이와는 별개로 ABA는 전분 함량과 관계 없이 protocorm의 증식과 묘조 분화를 억제하였다.

참 고 문 헌

- Abou-Mandour, A.A. and W. Hartung. 1980. The effect of abscisic acid on growth and development of intact seedlings, root and callus cultures and stem and root segment of *Phaseolus coccineus*. *Z. Pflanzphysiol.* **100**: 25-33.
- Akazawa, T., T. Minamakawa and T. Murata. 1964. Enzymic mechanism of starch synthesis in ripening

- Okamoto, K. and T. Akazawa. 1979. Purification of α - and β -amylase from endosperm tissues of germinating rice seed. *Agric. Biol. Chem.* **42**(7): 1379-1384.
- Ou-Lee, T.M. and T.L. Setter. 1985. Enzyme activities of starch and sucrose pathways and growth of apical and basal maize kernels. *Plant Physiol.* **79**: 848-851.
- Palmer, C.E. 1976. ADP-glucose pyrophosphorylase and UDP-glucose pyrophosphorylase activity in callus tissue during shoot initiation and callus growth. *Z. Pflanzenphysiol.* **77**: 345-349.
- Pierik, R.L. and H.H.M. Stegmans. 1975. Effect of auxin, cytokinin, gibberellins, abscisic acid and ethephon on regeneration and growth of bulblets on excised bulb scale segments of *Hyacinth*. *Physiol. Plant.* **34**: 14-17.
- Preiss, J. and C. Levi. 1980. Starch biosynthesis and degradation. In, *The Biochemistry of Plants*, J. Preiss (ed.), Vol 3. Academic Press, New York. pp. 371-423.
- Rajasekaran, K., M.B. Hein and I.K. Vasil. 1987. Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum. Effects *in vivo* and *in vitro* of glyphosate, Fluridone, and paclobutrazol. *Plant Physiol.* **84**: 47-51.
- Robyt, J.F. and S. Bemis. 1967. Use of the autoanalyzer for determining the blue value of the amylose-iodine complex and total carbohydrate by phenol-sulfuric acid. *Anal. Biochem.* **19**: 56-60.
- Ross, M.R., T.A. Thorpe and J.W. Costerton. 1973. Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. *Amer. J. Bot.* **60**: 788-795.
- Sasaki, T. and K. Kainuma. 1980. Solubilization of UDP-glucose-specific starch synthetase in sweet potato starch granules by the urea/pullulanase method. *Biochem. J.* **189**: 381-383.
- Sasaki, T. and K. Kainuma. 1984. Control of starch and exocellular polysaccharides biosynthesis by gibberellic acid with cells of sweet potato cultured *in vitro*. *Plant Cell Report* **3**: 23-26.
- Setter, T.L. and V.H. Meller. 1984. Reserve carbohydrate in maize stem [14 C]glucose and [14 C]sucrose uptake characteristics. *Plant Physiol.* **75**: 617-622.
- Tanaka, T., E. Isimoto, Y. Shimomura, M. Tanikuchi and S. Oi. 1987. Purification and some properties of raw starch-binding amylase of *Clostridium butyricum* T-7 isolated from mesophilic methane sludge. *Agric. Biol. Chem.* **51**(2): 339-405.
- Tanaka, Y., S. Minagawa and T. Akazawa. 1967. Association of enzyme proteins with starch granules in rice grains. *Stärke* **19**: 206-212.
- Thorpe, T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects In, *International Review of Cytology, Sppl. II A*. Academic Press, New York. pp. 71-111.
- Thorpe, T.A. 1982. Carbohydrate utilization and metabolism. In, *Tissue Culture in Forestry*. J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.), Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, The Hague. ISEN 90247-2660-3. pp.375-368.
- Thorpe, T.A. R.W. Joy, IV and D.W.M. Leung. 1986. Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. *Can. J. Bot.* **48**: 277-285.
- Tittle, F.L. and M.S. Spencer. 1986. Interactions between ethylene, CO₂ and ABA on GA₃-induced amylase synthesis in barley aleurone tissue. *Plant Physiol.* **80**: 1034-1037.
- Wetmore, R.H. and J.P. Rier. 1963. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. *Am. J. Bot.* **50**: 418-430.

(Received June 27, 1988)

- rice grains. *Plant Physiol.* **33**: 371–378.
- Arditti, J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. *In*, Advances in Botanical Research, H.W. Woolhouse (ed.), Vol. 7, Academic Press, New York. pp. 421–655.
- Barros, R.S. and S.J. Neill. 1987. Shoot growth in willow (*Salix viminalis*) in relation to abscisic acid, plant water status and photoperiod. *Physiol. Plant.* **70**: 708–712.
- Bernfield, P. 1955. α - and β -Amylases. *In*, Methods in Enzymology, S.P. Colowick and O. Kaplan (eds.), Vol. 1. Academic Press, New York. pp. 149–158.
- Boyer, C.D. and J. Preiss. 1979. Properties of citrate-stimulated starch synthesis catalyzed by starch synthase I of developing maize kernels. *Plant Physiol.* **64**: 1038–1042.
- Churchill, M.E., J. Arditti and E.A. Ball. 1971. Clonal propagation of orchids from leaf tips. *Am. Orchid Soc. Bull.* **40**: 109–113.
- Deacon, A.C. and P.P. Rutherford. 1972. Response of dandelion root tissue to treatment with 2, 4- and 3, 5-dichlorophenoxyacetic acid. *Phytochemistry* **11**: 3143–3148.
- Fonnesbech, M. 1972. Growth hormone and propagation of *Cymbidium in vitro*. *Physiol. Plant.* **27**: 310–316.
- Harrison, C. 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca*. *Bot. Gaz.* **138**: 41–45.
- Jacobsen, J.V. and P.M. Chandler. 1987. Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals. *In*, Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development, P.J. David (ed.), Masrtinus Nihoff Publishers, Dordrecht. pp. 164–193.
- Leung, D.W.M. and T.A. Thorpe 1985. Occurrence of α -amylases in tobacco callus: Some Properties and relationships with callus induction and shoot primordium formation. *J. Plant Physiol.* **117**: 363–370.
- Lindemann, E.G.P., J.E. Gunckel and O.W. Davidson. 1970. Meristem culture of *Cattleya*. *Am. Orchid Soc. Bull.* **39**: 1002–1004.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
- MacDonald, F.D. and J. Preiss. 1983. Solubilization of the starch granule-bound starch synthase of normal maize kernels. *Plant Physiol.* **73**: 175–178.
- MacDonald, F.D. and J. Preiss. 1985. Partial purification and characterization of granule-bound starch synthase from normal and waxy maize. *Plant Physiol.* **78**: 849–852.
- Mangat, B.S., F. Pasquini and N.N. Kapoor. 1985. Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the starch content of the biflagellate heterotroph *Polytoma uvella*: biochemical and scanning electron microscopic observations. *Can. J. Bot.* **63**: 527–532.
- Misra, S.P., L.D. Kapoor and R.S. Dhoudhri. 1975. Effect of herbicides on the carbohydrate and nitrogen contents of nutgrass (*Cyperus rotundus* L.). *Proc. Indian Acad. Sci.* **82**: 57–62.
- Morel, G.M. 1960. Producing virus-free *Cymbidiums*. *Am. Soc. Orchid Bull.* **29**: 495–508.
- Murashige, T. 1961. Suppression of shoot formation in cultured tobacco cells by gibberellic acid. *Science* **143**: 280.
- Nagl, W., J. Hedon and W. Rucker. 1972. DNA amplification in *Cymbidium* protocorms *in vitro*, as it relates to cytodifferentiation and hormone treatment. *Cell Differentiation* **1**: 229–237.
- Obata-Sasamoto, H and H. Suzuki. 1979. Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization *Physiol. Plant.* **45**: 320–324.