

연초(*Nicotiana tabacum* cv BY4) 이배체 및 반수체 식물의 캘러스로부터 식물체 재생 관련 효소의 변화

오승철 · 소웅영 · 조덕이¹ · 양덕춘^{*2}

전북대학교 생물학과, ¹전주우석대학교 생물학과, ²한국인삼연초연구원

Enzyme Activity in Plant Regeneration from Diploid and Haploid Calli of *Nicotiana tabacum* cv BY4

Seung Cheol OH, Woong Young SOH, ¹Duck Yee CHO, and Deok Chun YANG^{*2}

Department of Biology, Chonbuk University, Chonju, 560-756:

¹Department of Biology, Chonju Woosuk University Chonbuk, 565-800: and

²Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345. *Corresponding author.

Enzyme activities and phenolic compound were compared to investigate the physiological characteristics during shoot formation from diploid and haploid of *Nicotiana tabacum* cv BY4. The Nakata medium with 1.0 mg/L IAA, 0.5 mg/L Kinetin and 3 g/L active carbon was excellent to induce the haploid plants from the middle size anther within 30 days after culture. The MS medium with 0.5 mg/L 2,4-D was good for callus induction from leaf explants of diploid and haploid, and a lot of plants were regenerated from calli on the MS medium supplemented with 2.0 mg/L BAP. Activities of peroxidase for both of diploid and haploid plants were the highest at 2.0 mg/L BAP, but those of catalase at 1.0 mg/L BAP. Activities of IAA oxidase and catalase of haploid plants were higher than those of diploid plants. On the other hand, activity of peroxidase of haploid plants were lower than those of diploid plants.

Key words: catalase, IAA oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonium-lyase, phenolic compound

식물에서 반수체가 발견되고 이의 육종적 이용 가능성이 제시된 것은 1920년대부터였으며, 이후로 인위적인 반수체의 유기 방법이 개발되었으나 자연 상태에서 반수체 출현 빈도는 매우 낮았고, 획득 빈도도 개선되지 못하였다(Nakata and Kurihara, 1972). 식물의 반수체 생산에 가장 효과적인 방법으로 알려진 약배양의 경우 그 동안 배지나 배양 방법의 개선, 유용 재료의 선택 등 여러 분야에 대한 연구가 되어 왔다(Dunwell and Sunderland, 1974; Cho and Kwon, 1993). 특히 연초의 경우에는 Nakata와 Tanaka(1968)에 의하여 반수체가 유기된 이래 많은 연구가들에 의해 발전되어 대량생산이 가능하게 되었다(Nitsch and Nitsch, 1969; Nakata and Kurihara, 1972; Maheshwari et al., 1980).

식물 조직배양 기술을 이용하여 반수체 및 절편으로부터 캘러스를 유도한 후 배양하면 많은 세포를 동시에 사용할 수 있으므로 개체를 대상으로하는 경우에 비해서 돌연변이율이 높다(Widholm, 1977; Dix and Collin, 1990). 이러한

돌연변이 식물체의 염색체 배가를 통해 이배체 식물로 사용하면 육종 기간의 단축 등 상당한 이점이 많을 것으로 사료된다. 이때 식물체 재생의 차이는 식물체 재생을 유기시키는 물질의 많고 적음에 기인될 수 있으며, 반수체 및 이배체 등 식물체에 따라, 그리고 식물체의 부위에 따라 재생능력이 달리 나타날것으로 생각되며 이러한 차이는 여러 효소의 작용 때문으로 알려져 있다(van Huystee and Cairns, 1982; Kim et al, 1990; Han and Kang, 1990).

본 실험에서는 완전한 식물체 재생의 모델 시스템으로 이용되고 있는 연초를 사용 돌연변이 선발에 유용한 재료인 반수체를 유도하였으며, 캘러스로부터 식물체 재생시 변화되는 peroxidase, catalase, IAA oxidase, phenylalanine ammonium-lyase의 활성성과 페놀화합물의 함량을 조사하였다.

식물재료

본 실험에 사용한 재료는 한국인삼연초연구원 내의 온실에서 유지되고 있는 Bright Yellow에서 비홍엽계로 선발된 황색종 연초품종인 Bright Yellow 4(*Nicotiana tabacum* cv BY4)를 사용하였다.

반수체식물의 유도

연초로부터 발달 정도가 다른 화아를 각각 선별하여 70% 에틸알콜에 30초간 표면 살균한 후 3-4방울의 Tween 80이 첨가된 0.5% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침적한 다음 멸균수로 3회 세척하였다. 멸균된 화아로부터 약을 분리하여 Kinetin 0.5-2.0 mg/L, IAA 1-2 mg/L 및 30 g/L sucrose와 3 g/L 활성탄이 첨가되고 pH가 6.7로 조정된 Nakata배지(Nakata and Kurihara, 1972)에 5개씩 치상한 다음 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 조도 1,900 lux, 광주기는 16/8 h의 조건에서 배양하였다.

반수체 식물의 검정 및 증식

약배양을 통해 얻어진 식물체의 근단 5 mm를 잘라 0.05% colchicine에 2시간 전처리하여 1:3 acetic alcohol에 1시간 처리한 후 60°C 1N HCl에서 12분간 가수분해하였다. 가수분해된 뿌리의 끝 1 mm를 carbolfuchsin에 30분간 염색하여 압착법으로 염색체를 관찰하였다. 유도된 반수체 식물은 발근배지(1/2 MS배지, 100 mg/L myo-inositol, 6 g/L agar, 30 g/L sucrose, pH 5.8)로 옮겨 주었으며, 유리화 현상을 제거시키기 위해 1-3개의 소식물체를 이식하여 증식시켰다.

캘러스 유도 및 식물체 재생

온실에서 자라고 있는 연초 이배체식물의 잎을 70% 에틸알콜에 30초간 표면 살균한 다음 1% sodium hypochlorite에 15분간 침적시킨 후 멸균수로 3회 세척하였다. 반수체는 기내에서 자란 잎을 사용하였다. 잎의 주맥을 제거한 잎 절편을 7×7 mm의 크기로 하여 MS 기본배지(Murashige and Skoog, 1962)에 sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가하고 식물생장조절물질은 2,4-D가 0.5 mg/L 첨가된 배지에 치상하여 30일간 배양하였다. 배지는 100 mL 삼각 플라스크에 30 mL 씩 분주하고 1.2기압, 121°C 에서 15분간 스팀멸균 하였다. 식물체 재생은 이배체와 반수체 잎 절편 유래 캘러스로부터 BAP가 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L 각각 단독처리된 MS배지에서 실시하였으며, 재생된 식물체의 슈트의 수와 길이를 측정하였다.

효소활성도 측정

잎 절편에서 유도된 캘러스로부터 식물체 재생에 관계되는 효소인 peroxidase, catalase, IAA oxidase, phenylalanine ammonium-lyase (PAL) 등의 활성도와 페놀화합물의 함량을 조사하였다. 재료는 동결건조기(-70°C)에서 48시간 동결 건조한 후 냉장고에 보관하였다. 건조 중량 30 mg을 eppendorf tube에 넣고 완충 용액을 1.2 ml 가한 후 4°C 에서 유리봉으로 마쇄한 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 효소액으로 사용하였다. 효소 활성도 및 페놀화합물의 함량은 효소반응액의 흡광도를 spectrophotometer (Beckman DU-6)로 측정하였다. Peroxidase (EC 1.11.1.7)의 활성도는 Chance와 Maehly (1955)의 방법에 준하여 측정하였으며, Catalase (EC 1.11.1.6)는 Yang (1985) 등이 제시한 De-coupling방법으로 측정하였다. IAA oxidase의 활성도는 Kim (1981) 등의 방법을 수정하여 측정하였으며, PAL (EC 4.3.1.5)의 활성도는 Beaudoin-Eagan과 Thorpe (1985)의 방법을 수정하여 측정하였다.

페놀화합물의 추출은 동결 건조 시료 30 mg을 2N HCl을 넣고 마쇄하여 60분간 끓인 후 원심분리(15,000 rpm, 4°C , 15분)하여 상등액을 시료로 사용하였다. 시료 0.7 ml에 acetylaceton을 가하여 분획한 후 진공 건조시켜 1% HCl, methanol, Na_2CO_3 를 넣어 2분간 반응시킨 후, 50% folin시약을 첨가하여 다시 30분 반응시킨 다음 750 nm의 파장에서 흡광도를 조사하였다.

결과 및 고찰

약배양으로부터 반수체식물의 유도

온실에서 자란 연초 화아의 크기를 대(39 ± 1 mm), 중(20 ± 1 mm), 소(10 ± 1 mm)로 분류한(Figure 1A)다음, Nakata 배지(Nakata and Kurihara, 1972)에 kinetin 0.5-2.0 mg/L와, IAA 1-2 mg/L을 혼합 처리하고 3 g/L의 활성탄을 첨가하여 식물체 유도하였던 바, 배양 15일 후 약이 갈변되면서 약력이 터졌다(Figure 1B). 배양후 30일이 지난 다음 뿌리와 슈트의 출현이 관찰되었으며(Figure 1C), 45일 후에는 완전한 식물체로 자라는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 1D, E). 반수체의 발생은 화아의 크기에 따라 매우 다르게 나타났으며, 화아가 중간 크기에서 분리된 약으로부터 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 화아의 크기가 큰 것과 작은 것에도 1.0 mg/L IAA와 2.0 mg/L kinetin, 그리고 2.0 mg/L IAA와 2.0 mg/L kinetin처리시 반수체가 유도되었으며, 2.0 mg/L IAA와 1.0 mg/L kinetin 혼합처리구에서는 배양 30일 이후에는 90% 이상의 반수체가 유도되었다. 반면 화아의 크기가 중간된 것에서는 대부분의 처리구에서 반수체가 유도되었으며, 특히 IAA 1.0 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L이 조합처리된 배지에서는 배양 15일에 60%의 반수체가 유

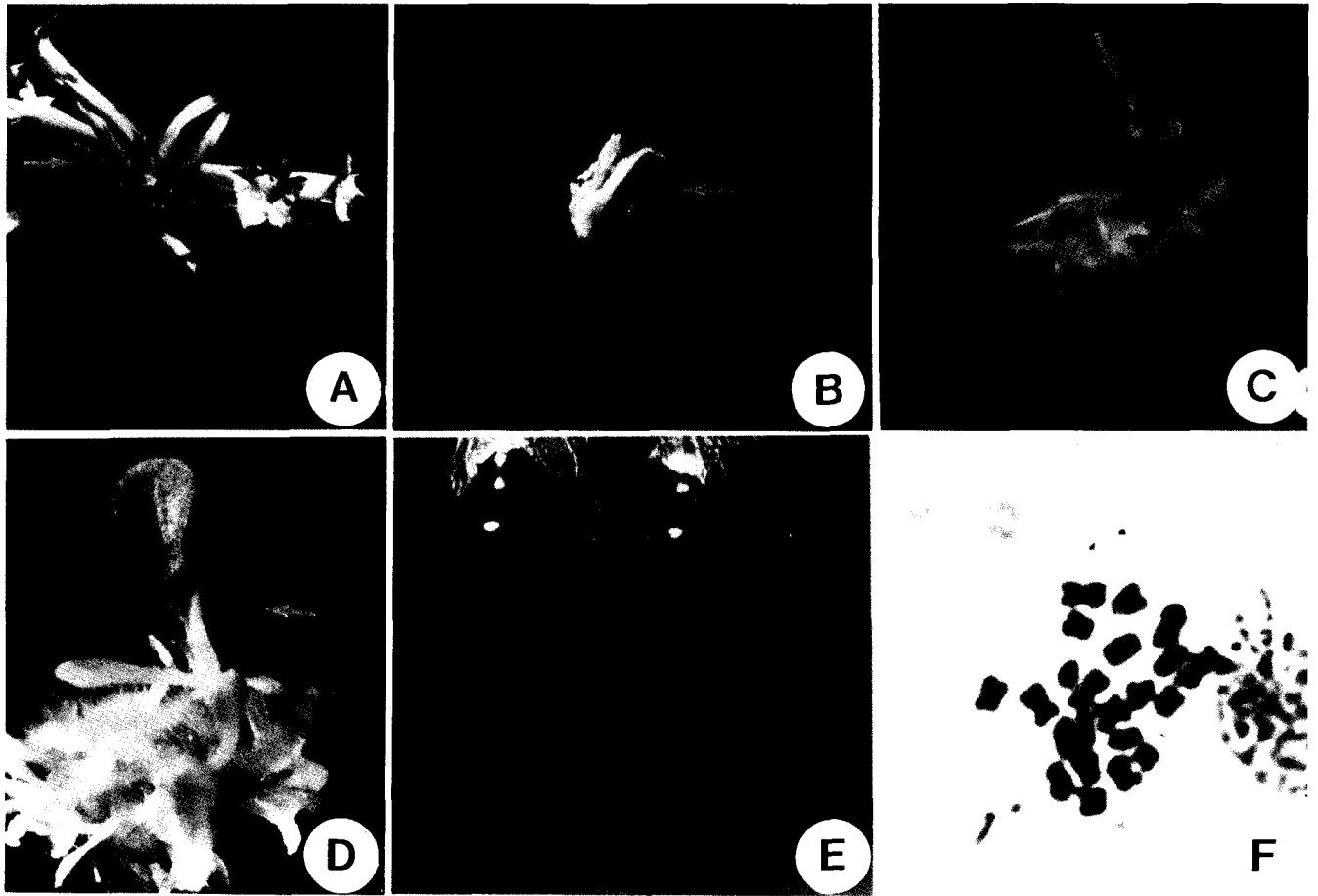


Figure 1. Induction of haploid plant by anther culture of *Nicotiana tabacum* cv BY4. A: Size of flower buds, B: Dihiscence of anther wall after 15 days of culture, C: Shoots induction from anther, D: Regenerated plants, E: Proliferation of plants, F: Chromosome complement observed in the regenerated haploid plant (n=24).

도되었으며 배양 30일 이후에는 93-95% 반수체 유도율을 나타내었다(Table 1).

약배양에서 얻어진 식물체가 소포자 유래의 반수체인지 여부를 알기 위하여 근단의 염색체수를 조사 하였던 바, n=24개로 반수체임을 확인할 수가 있었다(Figure 1F). 기내에서 재생된 식물체를 온실에서 순화시키면 식물체의 키와 잎이 작고, 약의 발달이 불량하여 외부형태적으로도 반수체임을 알 수 있었다.

반수체는 n의 염색체만을 가지고 있어서 2n개의 상동 염색체로 된 보통의 이배체에 비하여 식물체의 각 기관이 왜소하고 빈약한 것으로 알려져 있다(Lee, 1982). 반수체식물의 유도는 보통 약이나 화분배양을 통하여 얻는데 이때 식물체재생은 종에 따라서, 재료채취의 시기, 온도처리, 화학약품의 첨가가 효과적이라 보고하였다(Koltunow et al, 1990).

본 실험에서는 연초의 발달 단계가 다른 화아를 크기별로 채취하여 활성탄 3 g/L, IAA 1.0 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L이 첨가된 Nakata배지(Nakata and Kurihara, 1972)에서 배양한

Table 1. Effects of growth regulators and flower bud size on the haploid plant formation by anther culture of *Nicotiana tabacum* cv BY4.

Growth Regulators (mg/L)		Culture Days	Flower bud size								
			Large			Medium			Small		
IAA	Kinetin		15	30	45	15	30	45	15	30	45
1.0	0.5		- ^a	-	-	60 ^b	93	95	-	-	-
1.0	1.0		-	-	-	45	65	70	-	-	-
1.0	2.0		40	45	47	23	40	64	50	52	57
2.0	0.5		-	-	-	18	43	62	-	-	-
2.0	1.0		-	-	-	15	20	22	-	90	92
2.0	2.0		33	35	40	12	15	20	-	-	-

-^a: Not conducted.

^b: Percentage of plantlets formation from anther.

결과 20 ± 1 mm 크기의 화아에서 반수체 식물의 발생이 양호하였다(Table 1). Nakata배지는 활성탄이 첨가되고 kinetin은 첨가되지 않은 처리구에서 반수체를 획득하였기 때문에 본 실험과는 차이가 있었다. 아마도 이것은 품종의

선택, 배양 방법 등의 차이때문인 것으로 사료된다.

식물체의 절편을 배지에 치상함에 있어서 화분의 발달 상태를 조사할 필요가 있으나 연초의 경우 다른 식물에 비해 많은 배양기술이 축적되었고, 화아의 발달 상태와 화분의 발달 상태가 일치 한다고 알려져 있기 때문에(Koltunow et al, 1990) 화아를 기준으로 배양을 실시하였다. 연초의 약배양에 있어서는 배지에 치상할 약의 채취의 시기는 소포자가 1-2핵기인 때가 가장 적합하며, 이 시기는 품종에 따라서 다소 차이가 있으나 꽃받침 위로 화관이 출현되는 시기와 일치한다(Nitsch and Nitsch, 1969; Schrauwen et al, 1990). 그때의 화아의 크기는 대개가 16-18mm 정도로서 본 실험에서 사용한 중간크기의 화아와 비슷하였다. 반수체 식물체를 검정한 결과 n=24개로 염색체가 반감되어있음이 확인되었으며(Figure 1F) 외부형태상으로 Lee(1982)가 말한 것과 같이 개화기가 빠르고, 키가 작고, 약이 불충실했고, 잎이 작았다.

이배체와 반수체 식물의 배양을 통한 캘러스 증식 및 식물체 재생

약배양을 통하여 얻어진 소식물체를 나누지 않거나 많은 수를 이식하였을 경우에 있어서 유리화 현상이 일어나거나 생육이 불량하여 소식물체를 1-3개씩 약으로부터 분리하여 증식하였던 결과 유리화 현상이 제거되었으며 생장도 양호하였다. 이후 식물체의 증식은 정단으로부터 2-3개 정도의 잎을 가지고 있는 줄기를 잘라서 1/2 MS배지에 접종하여 식물체를 유지시켰다. 24-D가 0.5 mg/L 첨가된 MS배지에서 유도된 캘러스를 BAP가 농도별로 첨가된 배지에 이식 후 관찰하였던 바, 배양 25일 이후로부터 green spot를 형성하면서 배양 30일 이후로 슈트로 분화되는 것을 관찰할 수 있었다. 슈트와 캘러스가 혼합된 생중량은 1.5 mg/L BAP 첨가 처리구에서 30일 후에 이배체는 14.92 ± 2.7 g, 반수체는 12.59 ± 3.2 g으로 모두 생장이 양호하였으며, 슈트의 수

도 다른 처리구 보다 많았는 바, 이배체는 flask당 56개, 반수체는 44개로 매우 많은 양의 슈트를 유도하였다. 그러나 슈트의 길이는 1.5 mg/L BAP 처리구에 비해 2.0 mg/L BAP 처리구에서 더 좋은 경향을 나타냈는데 이배체는 61 mm, 반수체는 82 mm로, 비록 슈트의 수는 적었지만 길이가 더 긴 2.0 mg/L BAP 처리구가 연초의 재분화에 더 좋은 농도로 생각된다(Table 2).

이배체와 반수체 유래 캘러스의 효소활성도 및 페놀화합물 함량 함량의 조사

이배체와 반수체의 생리적 측면에서의 차이를 관찰하고자 peroxidase, catalase, IAA oxidase, phenylalanine ammonium-lyase (PAL)등의 효소활성도와 페놀화합물의 함량을 측정하였다(Figures 2 and 3).

Peroxidase의 활성도는 반수체 및 이배체 공히 BAP 0.5 mg/L부터 2.0 mg/L까지 농도가 증가할수록 높았으며, 반수체에 비해서 이배체가 활성도가 더 높은 경향을 보였다(Figure 2A).

Catalase의 활성도는 이배체와 반수체 모두 1.0 mg/L BAP의 처리구에서 보다 높은 활성도를 나타냈으나(Figure 2B), 더 이상 농도가 증가하면 오히려 활성도가 급격히 떨어지는 경향을 보였으며, peroxidase의 활성도와는 달리 이배체보다 반수체에서 더 높은 경향을 나타내었다(Figure 2B). IAA oxidase의 활성도는 이배체의 경우에는 1.0 mg/L BAP의 처리구에서, 반수체는 1.5 mg/L BAP의 처리구에서 다른 처리구에서 보다 높은 활성도를 나타냈고 catalase와 같이 반수체가 이배체보다 훨씬 높은 경향을 보였다(Figure 2C). Phenylalanine ammonium-lyase (PAL)에서는 이배체의 경우 0.5 mg/L BAP의 처리구에서, 반수체인 경우에는 있어서는 1.5 mg/L BAP의 처리구에서 다른 처리구에서 보다 높은 활성도를 나타냈다(Figure 2D).

BAP 처리시 페놀화합물의 변화되는 정도는 이배체인 경우에 있어서는 2.0 mg/L BAP의 처리구에서, 반수체인 경우에 있어서는 0.5 mg/L BAP의 처리구에서 다른 처리구에서 보다 높은 활성도를 나타냈다(Figure 3).

식물에 있어서 재생능력의 차이는 식물체재생을 유지시키는 물질의 많고 적음에 기인될 수 있으며, 식물의 종이나 배양절편의 부위에 따라 재생능력이 다르며(Skoog 1944), 재생능력이 있는 세포일지라도 오랫동안 계대배양을 하게 되면 재생능력을 잃어버리는것은 계속된 계대배양으로 배양세포내에 재생물질이 축적되지 못하기 때문(Smith and Street, 1974)인 것으로 알려져 있다. 이때 식물체의 재생을 유지하는 물질의 관련성이 밝혀지면 식물체의 재생을 인위적으로 조절할 수 있는 기술개발이 가능하다고(Ahn, 1990) 보고한 바 있다. 본 실험은 이배체와 반수체의 차이를 염색체와 외부형태적 차이뿐만 아니라 생리적 측면에서 차이를

Table 2. Effect of BAP on the shoot formation of haploid and diploid calli derived from *Nicotiana tabacum* cv BY4.

Callus	Conc.of BAP (mg/L)	Fresh weight of calli and shoots(g/flask)	No.of shoots	Length of shoots (mm)
Haploid callus	0.1	5.26 ± 1.5	0	0
	0.5	7.70 ± 2.5	25	35 ± 1.6
	1.0	10.68 ± 1.2	28	63 ± 1.8
	1.5	12.59 ± 3.2	44	75 ± 2.5
	2.0	11.11 ± 1.8	37	82 ± 2.4
Diploid callus	0.1	5.11 ± 0.6	2	18 ± 1.2
	0.5	5.72 ± 1.3	13	28 ± 2.4
	1.0	10.81 ± 0.9	39	51 ± 2.7
	1.5	14.92 ± 2.7	56	52 ± 1.8
	2.0	13.80 ± 2.5	40	61 ± 2.0

Data represent the mean \pm SE of five independent experiments.

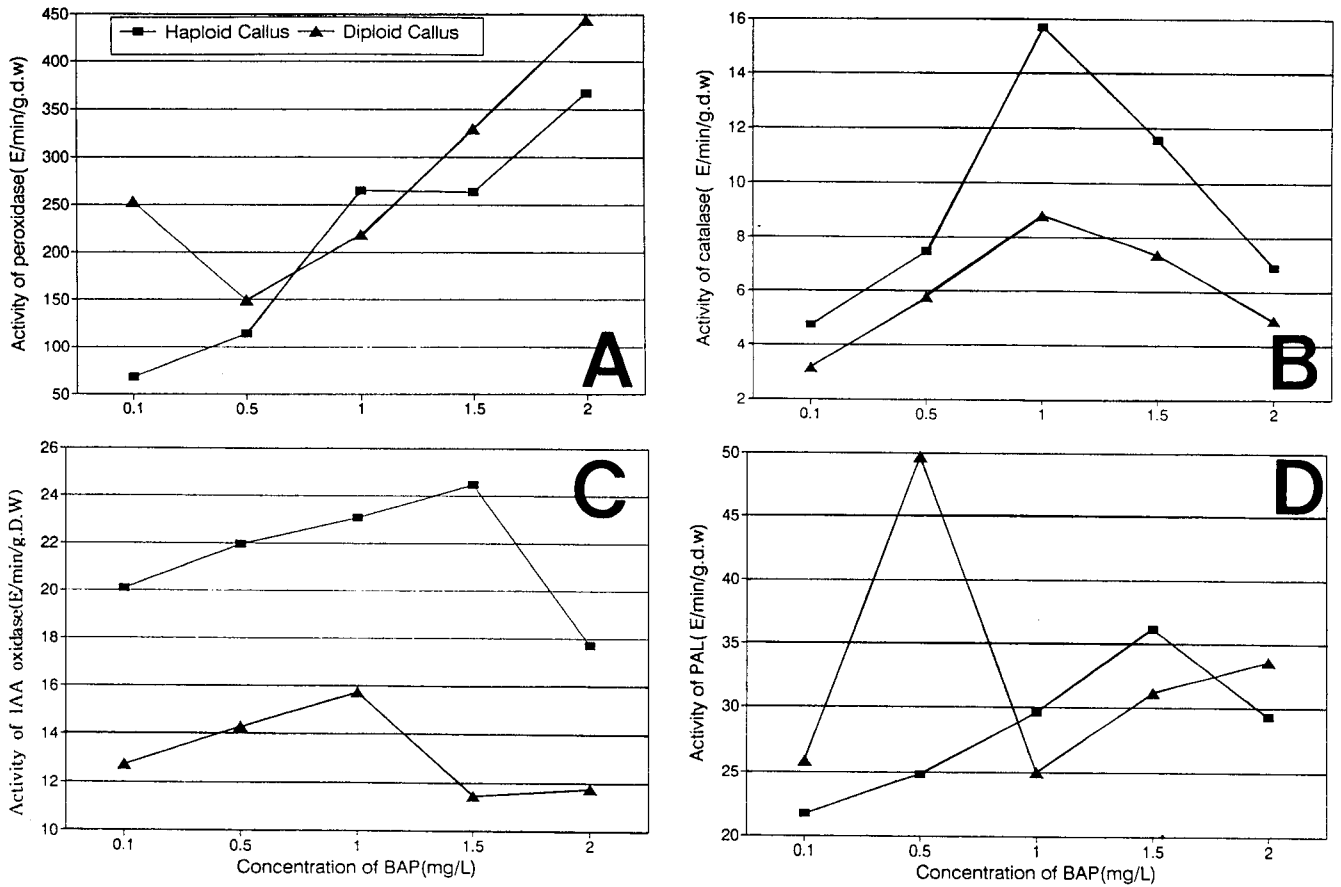


Figure 2. Activities of peroxidase (A), catalase (B), IAA oxidase (C) and phenylalanine ammonium-lyase (D) of *Nicotiana tabacum* cv BY4 haploid and diploid calli cultured on the media with various concentrations of BAP.

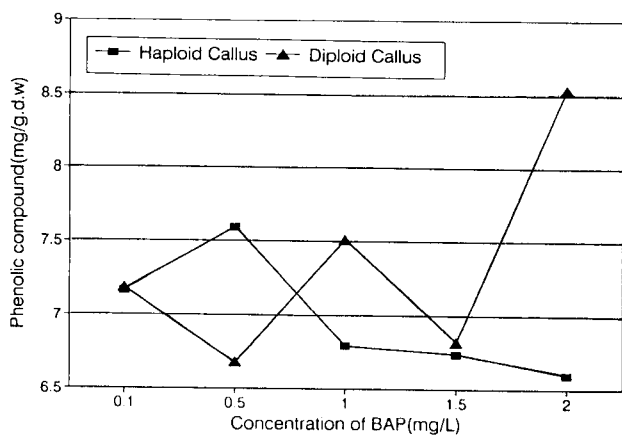


Figure 3. Effect of BAP on the content of phenolic compound of *Nicotiana tabacum* cv BY4 haploid and diploid calli.

조사하기 위해서 식물체재생에 있어서 중요한 요인으로 알려져 있는(Han and Kang, 1990; Ahn, 1991) 효소활성도 및 페놀함량을 측정하였다. Peroxidase의 활성은 반수체와 이배

체 공히 2.0 mg/L BAP에서 증가하는 경향을 보였으며 (Figure 2A), catalase의 활성도 역시 1.0 mg/L BAP 농도에 높은 경향을 보였다(Figure 2B). Peroxidase는 1966년 서양 고추냉이의 뿌리에서 처음 분리된 후 세포의 성장과 생육 발생을 조절하는 주요 효소로서 알려졌다(Miller et al., 1975). 이 효소의 활성과 특성의 변화는 기관의 원기 형성, 도관요소의 분화 및 세포막의 목질화에 영향을 주어 세포의 분화발달을 촉진한다(Mader and Fussl, 1982; Johnson-flanagan and Owens, 1985). Peroxidase의 활성은 식물체내의 catalase, IAA-oxidase, PAL 및 페놀화합물과 서로 차이를 나타내어 식물체재생에 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Putter, 1971; Compton and Preece, 1986). 또한 페놀화합물과 IAA 산화와 관계가 있다(Miller et al, 1975). Catalase는 H₂O₂를 두분자의 물과 산소를 분해하며 peroxidase와 같이 세포 내에서 다양한 활동을 하고 있다(Yang et al, 1985). 본 실험에서도 식물체의 재분화능이 높고 슈트의 길이가 더 긴 2.0 mg/L BAP 처리농도에서 peroxidase의 활성도도 증가하는 경향을 보였다(Figure 2A). IAA oxidase의 활성은 1.5 mg/L BAP에서 활성도가 높았으며, 반수체에 비해서 2

배체가 훨씬 높은 경향을 보였다(Figure 2C). IAA-oxidase는 peroxidase와 catalase 같이 식물체내에 광범위하게 존재하는 IAA 조절효소이며, 페놀화합물에 의해서 조절 되고 있다 (Vioque et al., 1981; Mato and Vieitez: 1886).

식물의 이차대사산물에 관여하는 효소 중 가장 많이 연구된 phenylalanine ammonia-lyase(PAL)은 반수체인 경우에는 1.0 mg/L BAP, 이배체의 경우에는 0.5 mg/L BAP에서 활성도가 높았다(Figure 2D). PAL은 페놀이 합성되는 shikimate pathway에서 key enzyme으로 작용하는 효소로 알려져 있다(Camm and Towers, 1973). 또한 연초 캘러스로부터 슈트가 발생하는 시기에는 PAL의 활성이 높게 나타나는데(Beaudoin-Eagan and Thorpe, 1985), Ahn(1990)에 의하면 인삼 캘러스로부터 체세포 배가 발생하는 시기에 PAL의 활성이 낮아지는 것으로 보고하여 캘러스로부터 식물체의 재생은 체세포배의 발생과는 다른 현상임을 보고하였다. 본 실험에서는 슈트의 수가 많아지는 1.5 mg/L BAP 농도에서는 PAL의 활성도가 증가하였으나, 슈트의 길이가 길어지는 2.0 mg/L BAP 농도에서는 다소 감소하는 경향을 나타냈다(Figure 2D).

페놀화합물 함량의 경우 반수체에서는 0.5 mg/L BAP에서, 이배체인 경우에는 2.0 mg/L에서 높았다(Figure 3). 페놀화합물은 peroxidase에 의해 세포벽의 목질화에 영향을 끼쳐 세포의 분화 발달을 촉진한다(van Huystee and Cairns, 1982). 이러한 페놀화합물중 mono phenol류인 salicylic acid, p -coumaric acid는 IAA oxidase cofactor로서 IAA의 산화를 촉진하며, diphenol류인 caffeic acid catechol 및 폴리페놀은 IAA oxidase의 활성을 억제함으로써 식물세포내에 존재하는 IAA함량을 조절하는 것으로 알려져 있다(Krishnamoorthy, 1981).

적 요

연초의 약배양에 의해서 반수체를 유기하고 형성된 반수체와 이배체의 캘러스로부터 식물체 분화과정에서 일어나는 생리적 차이점을 비교하고자 효소의 활성도와 페놀화합물의 함량을 비교 조사하였다. 반수체의 형성은 화아가 중간정도된 크기를 이용하여 IAA가 1.0 mg/L, kinetin이 0.5 mg/l 조합 처리되고 활성탄이 3 mg/L 함유된 배지에서 가장 양호하였다. 캘러스의 유도는 이배체 및 반수체 공히 2,4-D의 농도가 0.5 mg/L 첨가된 배지에서 양호하였으며, 캘러스로부터 재분화는 BAP 농도 2.0 mg/L에서 효과적이었다. 재분화시 변화되는 효소의 활성도와 페놀화합물의 함량은 처리된 BAP의 농도와 사용한 식물체에 따라 차이가 있었다. Peroxidase의 활성도는 이배체 및 반수체 공히 BAP 농도가 2.0 mg/L일때 가장 높았으며, catalase의 활성도는 BAP의 농도가 1 mg/L일때 가장 높은 경향을 보였다. IAA

oxidase 및 catalase의 활성도는 이배체에 비해 반수체에서 더 높은 경향을 보였으나 peroxidase의 활성도는 이배체가 더 높은 경향을 나타내었다.

인 용 문 헌

- Ahn IO (1990) Quantitative changes in major metabolites during somatic embryogenesis in tissue culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Ph. D. thesis, Seoul National University, Suwon
- Beaudoin-eagan LD, Thorpe RA (1985) Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiol* 78: 438-441
- Camm EL, Towers GHN (1973) Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry* 12: 961-973
- Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymol* 2: 264
- Compton ME, Preece JE (1986) Exudation and explant establishment. *Newsletter* 50: 9-17
- Dix PJ, Collin HA (1990) Culture systems and selection procedures. In PJ Dix, ed, *Plant Cell Line Selection*. VCH pp 3-18
- Dunwell JM, Sunderland N (1974) Pollen ultrastructure in anther culture of *Nicotiana tabacum* J Exp Bot 25: 352-361
- Han TJ, Kang YH (1990) Influence of change in IAA-oxidizing enzyme activities on shoot differentiation in *Cymbidium* sp. protocorms. *Korean J Bot* 33: 105-110
- Johnson-flanagan AM, Owens JN (1985) Peroxidase activity in relation to suberization and respiration in white spruce (*Picea glauca*[Moench] voss) seedling roots. *Plant Physiol* 79: 103-107
- Kim ES, Kim MW, Kang YH, Yang DJ (1990) Studies on growth and differentiation of suspension-cultured carrot cells. *Korean J Bot* 33: 259-269
- Kim JC, Yoon KE, Lee KW (1981) The peroxidase isozymes and their activities in callus suspension-cultured cells and leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Korean J Bot* 24: 87-98
- Koltunow AM, Truettner J, Cox KH, Wallrith M, Goldberg RB (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *The Plant Cell* 2: 1201-1224
- Krishnamoorthy NH (1981) Auxin In *Plant Growth Substances* (Krishnamoorthy ed.). pp.12-14 Tata Mcgraw-Hill press, New Delhi
- Lee SC (1982) Diallel analysis of quantitative characters of fluepured tobacco varieties (*Nicotiana tabacum* L.). *J Korea Society of Tobacco Science* 4: 23-30
- Mader M, Fussl R (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells II. Regulation by phenolic compounds. *Plant Physiol* 70: 1132-1134
- Maheshwari SC, Tyagi AK, Malhotra K (1980) Induction of haploid from

- pollen grain in angiosperms the current status. *Theor Appl Genet* **58**: 193-206
- Mato MC, Vieitez AM** (1986) Changes in auxin protectors and IAA oxidase during the rooting of chestnut shoots in vitro. *Physiol Plant* **66**: 491-494
- Miller RW, Sirois JC, Morita H** (1975) The reaction of coumarins with horseradish peroxidase. *Plant Physiol* **55**: 35-41
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassaya with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Nakata K, Kurihara M** (1972) Competition among pollen grains for haploid tobacco plant formation by anther culture. *Japan J Breed* **22**: 92-98
- Nakata K, Tanaka M** (1968) Differentiation of embryoid from developing germ cell in anther culture of tobacco. *Japan J Genet* **43**: 65-71
- Nitsch JP, Nitsch C** (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science (N.Y)* **163**: 85-87
- Putter J** (1971) Peroxidase. In U Bergmeyer, ed, *Methods of Enzymetic Analysis*. Academic Press. pp 685-690
- Schrauwen JAM, Groot PFM, van Herpen MMA** (1990) Stage-related expression of mRNAs during pollen development in lily and tobacco. *Planta*: 298-304
- Skoog F** (1944) Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Amer J Bot* **31**: 14-24
- Smith SM, Street HE** (1974) The Decline of Embryogenic potential as Callus and suspension cultures of Carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Ann Bot* **38**: 223-241
- van Huystee, Cairns WI** (1982) Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Phytochemistry* **21**: 1843-1847
- Vioque A, Albi MA, Vioque B** (1981) Role of IAA-oxidase in the formation of ethylene from 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acid. *Phytochemistry* **20**: 1473-1475
- Widholm JM** (1977) Selection and characterization of biochemical mutants. In W. Barz, E. Reinhard, MH Zenk, eds, *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. pp 112-122
- Yang DC, Quae C, Yoon JJ, Lee SJ, Lee AR** (1985) A new method on the Measurement of catalase activity of *Panax ginseng* C.A. Meyer Tissue. *Korean J. Ginseng Sci* **9**: 154-162

(1994년 10월 15일 접수)