

인삼 모상근의 색소 생성 및 엽록체 발달에 미치는 광의 효과

양덕조 · 최혜연 · 김용해 · 윤길영 · 양덕춘¹

충북대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹한국인삼연초연구원

(1997년 3월 7일 접수)

Effects of Light on the Pigment Production and Chloroplast Development of Ginseng Hairy Roots

Deok-Cho Yang, Hye-Yeon Choi, Yong-Hae Kim, Kil-Young Yun and Deok-Choon Yang¹

School of Life Sciences, College of Natural Science, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

¹Korea Ginseng and Tobacco Reserch Institute, Taejeon 305-345, Korea

(Received March 7, 1997)

Abstract : The effects of light on the pigment production and chloroplast development were examined on ginseng hairy roots cultured in 1/2MS liquid medium. The chlorophyll and carotenoid production were increased from 1,000 to 3,500 lux condition, but decreased drastically in 7,000 lux condition. The anthocyanin production was significantly increased with increment light intensity(1,000~7,000 lux). The thylakoid membrane of chloroplast was proplastid in dark condition and it began to develop into thylakoid membrane in 1,000 lux condition and then intact thylakoid membrane was developed in 3,500 lux condition. However, the development of thylakoid membrane in 7,000 lux condition was inhibited comparing to 3,500 lux condition. The total chlorophyll production in blue light condition were high comparing to other wavelength and same as 40% of total chlorophyll on white light(3,500 lux) condition. The chlorophyll and carotenoid production by sucrose concentration were high in 3% sucrose condition and anthocyanin production was high in 4% condition. The production of chlorophyll and carotenoid by light periods was high when explants were cultured in dark condition for 1 week and then transferred to light condition for 4 weeks. Our results suggest that pigment production and chloroplast development could be accelerated by light intensity of specific wavelength in cultures of ginseng hairy root.

Key words : Ginseng, chloroplast, chlorophyll, thylakoid membrane, blue light

서 론

인삼의 ginsenosides은 인삼속 식물에만 함유된 triterpenoid의 dammarane 골격을 가진 배당체^{1,2)}로서 특이한 약리효능으로 자양강장, 당뇨병 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.³⁾ 최근 ginsenosides을 기내 배양을 통하여 생산하고자 하는 연구가 활발히 진행 중에 있고, 인삼 모상근 배양을 통한 ginsenosides의 생산을 시도하고 있으며, 특정 ginsenosides의 생산에도 많은 관심을 가지고 있다.⁴⁻⁶⁾ 인삼의 ginsenosides

는 panaxadiol(PD)계와 panaxatriol(PT)계로 구분 되는데 PD계는 중추신경 진정효과가 있으며, PT계는 콜레스테롤의 함량을 감소 시키는 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다.⁷⁻⁹⁾ 특히 Rg1은 항피로효과, Re는 콜레스테롤 함량 감소효과^{10,11)}, Rf는 알콜손상뇌의 보호활성이 있는 것으로 밝혀졌다.¹²⁾ 따라서 이들 각각의 ginsenosides의 효능이 다르기 때문에 특정 ginsenosides의 생성을 위한 연구가 요구되고 있는 실정이다. 본 연구진은 최근 인삼 모상근에서 ginsenosides의 생산성 향상 및 특정 ginsenosides의 생산을

위한 연구에서 광도 및 특정과장에 의하여 특정 ginsenosides의 생성이 증가될 수 있다고 하였다.¹³⁾ Yang등¹³⁾은 광상태하에서 ginsenosides의 생성이 향상되는 이유로서, 광에 의해 발달된 엽록체가 광합성을 수행하여 인삼 모상근의 성장 및 ginsenosides의 생성이 향상된다고 하였다. 따라서 본 연구는 광상태하에서 배양된 모상근의 색소의 생성 및 엽록체 발달을 조사하기 위하여 시도되었다.

재료 및 방법

1. 식물재료

본 실험에 사용된 식물재료는 *Agrobacterium rhizogenes* A4 균주를 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)뿌리 절편에 접종하여 유기한 인삼 모상근(GhrA4)을 사용하였다. 실험에 사용된 모상근은 계대배양 후 3주가 경과하여 새로 형성된 모상근의 선단부위를 1.5cm로 균일하게 절단하여 1/2 MS 액체배지에 접종하여 5주간 배양하였다.

2. 광처리 조건

백색광의 광도조절 및 광과장 처리는 Yang등¹³⁾의 방법과 동일하게 수행하였다.

3. Chlorophyll 및 anthocyanin 함량 측정

Chlorophyll 및 carotenoid의 함량은 냉동건조시킨 조직 50 mg을 85% acetone 700 μ l로 마쇄하여 10,000 \times g에서 10분동안 원심분리한 후 상등액을 Roebbelen의 방법¹⁴⁾에 준하여 측정하였다. Anthocyanin 함량은 위의 pellet에 1% HCl/MeOH 700 μ l를 넣고 10,000 \times g에서 10분동안 원심분리한 후 상

등액을 531 nm에서 상대흡광도를 측정하여 anthocyanin 함량을 비교하였다.

4. 투과전자현미경(TEM)에 의한 모상근의 엽록체 관찰

모상근 조직을 증류수와 phosphate (pH 7.2) buffer로 세척후 동일 buffer내에서 1 mm² 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde가 함유되어 있는 phosphate buffer로 15분씩 3회 세척한 후, 1% osmium tetroxide로 12시간 동안 고정하였다. 고정된 시료를 다시 phosphate buffer로 15분간 3회 세척한 후, graded alcohol series로 15분간 1회씩 탈수시킨 후, 탈수된 시료를 propylene oxide로 치환하여 propylene oxide와 Spurr's resin의 혼합액(ERL 4206; 10 g, DER 736; 6 g, NSA 26 g, S-1: 0.4 g) 3:1, 1:1, 1:3의 비율로 30분 동안 치환하였다. 시료는 block에 Spurr's resin와 함께 넣고 70°C에서 9시간 동안 polymerization시켜 embedding 하였다. 포매 후 resin block을 trimming하여 미세박편(silver & gold color)으로 만들어 uranyl acetate 와 lead citrate로 염색한 후 투과전자 현미경(Carl Zeiss, EM 109)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

인삼 모상근에서 색소합성과 엽록체 발달에 미치는 광의 효과를 조사하기 위하여 광도별(1,000, 1,700, 3,500, 7,000 lux)로 처리하여 5주간 배양하였다. 광도가 증가할수록 모상근의 성장이 감소하였으며, 3,500 lux 처리구에서 모상근이 비후되고 분지능이 감소하는 반면, 7,000 lux 처리구에서 모상근의 비

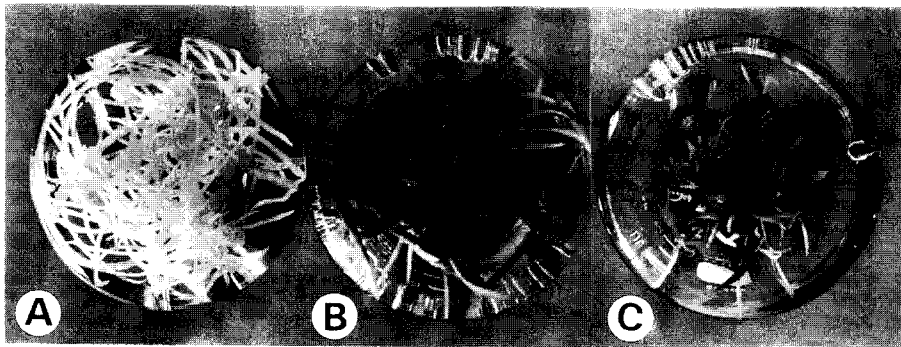


Fig. 1. Effects of light intensity on the growth of ginseng hairy roots cultured in 1/2MS liquid medium for 5 weeks at 23°C. The initial inoculum per treatment was 10 hairy root tips (size; 1.5 cm) A; Dark condition, B; 3,500 lux condition, C; 7,000 lux condition.

후는 관찰되지 않았고 측근이 형성되었다(Fig. 1). 엽록소의 형성은 광도에 따라 3,500 lux 까지 증가하다가 7,000 lux에서 감소한 반면, 적색 계통의 anthocyanin이 생성되었다(Fig. 1, Table 1). 3,500 lux 처리구에서 Chl. a, Chl. b 및 carotenoid의 함량이 가장 높았으며, 7,000 lux 처리구에서 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. Chl. a 와 Chl. b의 비율은 낮은 광도에서 높은 반면, 광도가 증가할수록 감소하여 3,500 lux 처리구에서 3.58를 나타내었다. 또한 carotenoid는 1,700 lux 까지는 완만하게 증가하다가 3,500 lux 처리구에서는 1,700 lux 처리구 보다 2.5배 높은 함량 증가를 나타내었다. Anthocyanin은 광도가 증가할수록 비례하여 생성되었다(Table 1). 이상의 결과에서 인삼모상근의 엽록소 생성에 적절한 광도는 3,500 lux이며, 3,500 lux 처리구에서 carotenoid의 함량이 갑자기 증가하는 것으로 볼 때, 보조색소로서 뿐만 아니라 엽록체에서 생성되는 많은 산화제^{15, 16)}로부터 엽록소의 보호기능을 위한 생성으로 생각된다. Juvenile anthocyanin의 합성은 피토크롬에 의하여 조절되는 PAL-activity에 의한 것으로 알려져 있는데¹⁷⁾, 이 색소의 합성은 빛에 따른 PAL-activity 증가로 기인된다. 엽록소 함량이 7,000 lux에서 급격히 감소하는 경향은 뿌리조직에서 유기한 모상근에서 형성된 엽록체 및 표피세포가 빛에 대한 보호장치가 덜 발달되어 있거나 LHCP에 의한 광에너지 분배가 억제되어 있기 때문으로 생각된다. 그와 반대로 유형기 광보호 기능을 담당하고 있는 anthocyanin은 광도가 증가할수록 함량도 증가하여 7,000 lux 처리구에서는 1,000 lux 처리구보다 4.9배 높은 함량을 나타내었다(Table 1).

인삼 모상근에서 광도에 따른 엽록체의 발달 양상을 조사하기 위하여 투과전자현미경(TEM)으로 관찰하였다. 암상태에서는 틸라코이드막이 발달한 엽록체

는 전혀 관찰되지 않았고, 전색소체만 관찰 할 수 있었다(Fig. 2) 1,000 lux 처리구에서는 thylakoid membrane이 발달하기 시작하여 grana와 stroma thylakoid membrane로 분화되기 시작하였으며, 광합

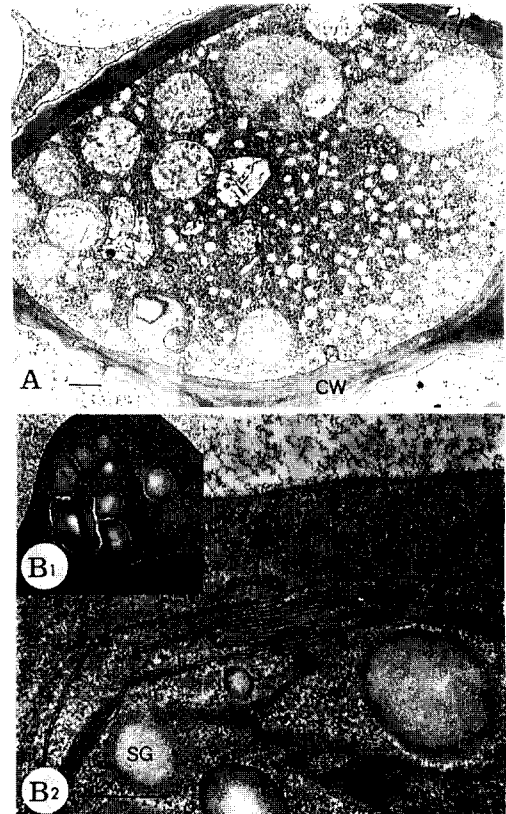


Fig. 2. Effects of light intensity on the chloroplast development of ginseng hairy roots cultured in 1/2MS liquid medium for 5 weeks at 23°C. A; dark condition, B; 1,000 lux condition. C; chloroplast, CW; cell wall, G; grana, M; mitochondria, OG; osmiophilic globule, S; stroma, P; proplastid, SG; starch grain, Bar=0.5 μm.

Table 1. Effects of light intensity on the chlorophyll, carotenoid and anthocyanin production of ginseng hairy roots cultured according to light intensity in 1/2 MS liquid medium for 5 weeks at 23°C (Unit : μg·g dw⁻¹)

Light intensity (Lux)	PIGMENT CONTENTS					
	Chl. T	Chl. a	Chl. b	a/b	Caro.	Anto.**
100	7.836	6.317±0.247*	1.519±0.028	5.15	4.211±0.015	0.108±0.015
1700	12.958	10.361±0.312	2.597±0.214	3.99	4.544±0.124	0.168±0.032
3500	18.067	14.125±0.224	3.942±0.118	3.58	11.457±0.214	0.355±0.116
7000	8.078	6.365±0.128	1.713±0.098	3.71	5.552±0.065	0.530±0.014

The initial inoculum was 10 hairy root tips(size; 1.5 cm). *, standard errors, **, Unit of anthocyanin contents indicates relative optical density. Chl.; chlorophyll, Caro.; carotenoid, Anto.; Anthocyanin



Fig. 3. Effect of light intensity on the chloroplast development of ginseng hairy roots cultured in 1/2MS liquid medium for 5 weeks at 23°C. C; 1,700 lux condition, D; 3,500 lux condition C; chloroplast, CW; cell wall, G; grana, M; mitochondria OG; osmiophilic globule, S; stroma, SG; starch grain, Bar=0.5 μm

성 산물인 starch grain이 관찰되었다(Fig. 2). 1,700 lux 처리구에서는 grana와 stroma thylakoid membrane의 구분이 확실하게 나타났으며, 3,500 lux에서는 intact한 틸라코이드막으로 발달된 완전한 엽록체가 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 7,000 lux 처리구에서는 많은 starch grain이 관찰되었으나, thylakoid membrane의 발달이 다소 억제되었다(Fig. 4). 이상의 결과에서 인삼 모상근의 엽록소 합성 및 엽록체 발달은 3,500 lux 처리구에서 양호하였기 때문에 gin-

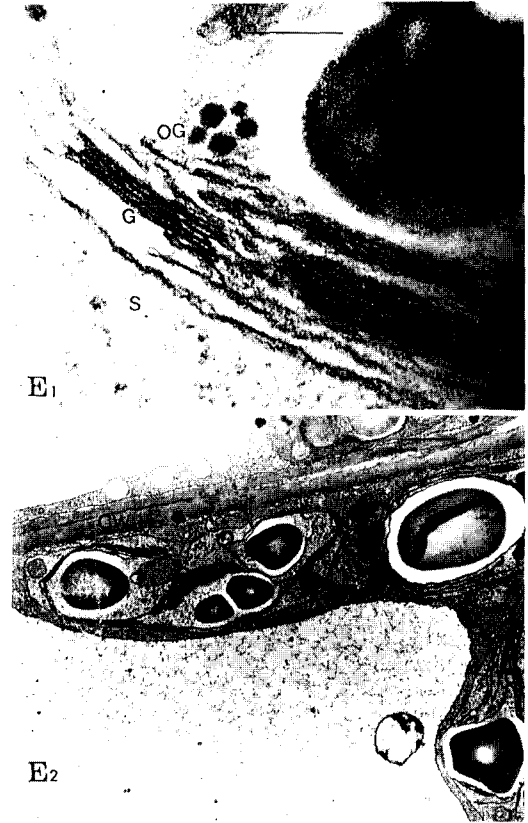


Fig. 4. Effects of light intensity on the chloroplast development of ginseng hairy roots cultured in 1/2MS liquid medium for 5 weeks at 23°C. E; 7,000 lux condition. C; chloroplast, CW; cell wall, G; grana, OG; osmiophilic globule, S; stroma, SG; starch grain, Bar=0.5 μm.

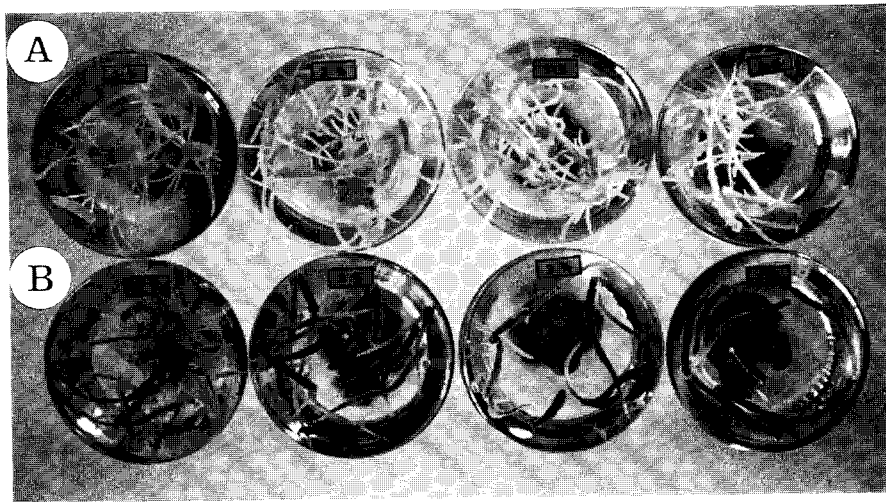
senosides 생산을 위한 모상근 배양은 7,000 lux 이하 광도에서 수행되어야 된다고 생각된다.

광과장에 따른 모상근의 chlorophyll 생성은 청색과장에서 높게 나타났다(Table 2). 청색과장에 의한 총엽록소의 함량은 6.00 μg g dw⁻¹로 백색광의 40% (18.23 μg g dw⁻¹)까지 합성하였다(Table 2). Carotenoid의 함량도 청색과장에서 다른 과장 보다 다소 높은 함량을 나타내었는데, 이는 백색광과 비교하여 약 20% 정도로 낮은 carotenoid를 생성하였다. 이러한 결과는 담배세포의 현탁배양에서 청색광에 의하여 chlorophyll의 합성이 촉진된다는 결과¹⁰⁾와 일치하였다. Anthocyanin의 생성은 적색과장에서 다소 높게 나타났으며, 광도가 증가할수록 안토시안 합성이 촉진되었다.

Table 2. Effects of light quality on the chlorophyll, carotenoid and anthocyanin production of ginseng hairy roots cultured according in 1/2 MS liquid medium for 5 weeks at 23°C (Unit : $\mu\text{g}\cdot\text{g dw}^{-1}$)

Light quality	PIGMENT CONTENTS					
	Chl. T	Chl. a	Chl. b	a/b	Caro.	Anto.**
Red	1.882	1.242±0.135	0.640±0.018	1.94	1.380±0.091	0.049±0.005
Yellow	1.142	0.687±0.132	0.455±0.115	1.51	1.004±0.026	0.038±0.021
Green	4.818	4.108±0.154	0.710±0.065	5.78	2.057±0.098	0.049±0.017
Blue	7.450	6.000±0.215	1.450±0.078	4.14	2.487±0.102	0.042±0.014
White	18.233	13.633±0.348	4.600±0.173	2.96	12.126±0.216	0.393±0.065

The initial inoculum was 10 hairy root tips(size: 1.5 cm). *: standard errors, **: Unit of anthocyanin contents indicates relative optical density. Chl.: chlorophyll, Caro.: carotenoid, Anto.: Anthocyanin, Light quality intensity: 200 lux, White light intensity: 3500 lux.

**Fig. 5.** Effects of sucrose concentration on the growth and pigment production of ginseng hairy roots cultured in 1/2MS liquid medium for 5 weeks at 23°C. The initial inoculum was 10 hairy root tips (size: 1.5 cm). A; Dark condition, B; Light condition (3,500 lux).

Yang등¹³⁾은 인삼 모상근은 광상태하에서 엽록체의 발달로 인하여 sucrose의 요구도가 달라진다고 하였으며, 담배 캘러스 배양시 sucrose의 농도를 3%에서 1%로 낮출 경우 엽록소의 합성이 촉진된다는 보문¹⁴⁾이 있다. 따라서 광상태하에서 sucrose 농도에 따른 엽록소의 생성을 조사 하였던 바, 1% sucrose 처리구에서 모상근의 성장이 가장 높았으며¹⁵⁾, 주근의 엽록소 생성은 다른 처리구 보다 높은 반면 새로 형성된 측근은 엽록소 생성이 낮았다(Fig. 5). Sucrose 농도가 3% 까지 증가할수록 측근의 발달이 억제된 반면, 주근의 엽록소 및 카로티노이드 형성이 촉진되었으며, 이 antocyanin의 합성은 sucrose 농도가 4% 까지 증가할수록 촉진되는 양상을 보였다(Table 3). 이와같은 결과로 미루어 볼 때 인삼 모상근은 낮은 농도의

sucrose보다는 3%정도의 sucrose에서 엽록소 생성이 가장 왕성하기 때문에 광상태에서 2차대사 산물 획득을 위한 모상근 배양에서는 3% sucrose가 최적량으로 생각된다.

인삼의 모상근을 배양하면 광상태하에서 색소와 ginsenosides의 생성이 촉진되는 반면, 성장은 억제된다.¹³⁾ 따라서 엽록체의 발달과 모상근의 성장이 공히 좋은 광주기를 확인하고자 이단계 배양에 따른 색소 함량을 조사하였다. 전체 엽록소의 함량은 명(明)주기가 증가할수록 증가하여 chlorophyll의 생성은 암1주:명4주(D1L4)처리구에서 엽록소 및 carotenoid의 함량은 가장 높았다(Table 4). Anthocyanin을 제거한 모든 색소의 생성은 명5주기(L5D0)에서 보다 암1명4(D1L4)에서 높은 경향을 나타내었다.

Table 3. Effects of sucrose concentration on the chlorophyll, carotenoid and anthocyanin production of ginseng hairy roots cultured 1/2 MS liquid medium for 5 weeks at 23°C (Unit : $\mu\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{dw}^{-1}$)

Sucrose con.(%)	PIGMENT CONTENTS					
	Chl. T	Chl. a	Chl. b	a/b	Caro.	Anto.**
1	9.701	7.740 \pm 0.307*	1.961 \pm 0.157	3.94	6.320 \pm 0.231	0.132 \pm 0.014
2	14.300	10.540 \pm 0.131	3.760 \pm 0.053	2.80	9.420 \pm 0.125	0.177 \pm 0.012
3	16.667	11.720 \pm 0.140	4.947 \pm 0.044	2.36	10.820 \pm 0.072	0.285 \pm 0.024
4	11.840	8.520 \pm 0.193	3.320 \pm 0.174	2.56	8.720 \pm 0.164	0.324 \pm 0.009

The initial inoculum was 10 hairy root tips(size: 1.5 cm). *: standard errors, **: Unit of anthocyanin contents indicates relative optical density. Chl.: chlorophyll, Caro.: carotenoid, Anto.: Anthocyanin, Light condition: 3,500 lux

Table 4. Effects of light periods on the chlorophyll, carotenoid and anthocyanin production of ginseng hairy roots cultured in 1/2 MS liquid medium for 5 weeks at 23°C (Unit : $\mu\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{dw}^{-1}$)

Light periods	PIGMENT CONTENTS					
	Chl. T	Chl. a	Chl. b	a/b	Caro.	Anto.**
D4L1	2.766	2.366 \pm 0.307*	0.400 \pm 0.007	5.915	3.700 \pm 0.153	0.043 \pm 0.008
D3L2	6.033	5.266 \pm 0.131	0.767 \pm 0.033	6.866	5.467 \pm 0.067	0.067 \pm 0.002
D2L3	9.933	8.100 \pm 0.140	1.833 \pm 0.088	4.419	7.167 \pm 0.120	0.142 \pm 0.014
D1L4	18.900	14.533 \pm 0.233	4.367 \pm 0.033	3.328	11.800 \pm 0.252	0.219 \pm 0.039
D0L5	15.533	12.400 \pm 0.351	3.1330 \pm 0.167	3.958	10.000 \pm 0.300	0.311 \pm 0.021

The initial inoculum was 10 hairy root tips(size: 1.5 cm). *: standard errors, **: Unit of anthocyanin contents indicates relative optical density. Chl.: chlorophyll, Caro.: carotenoid, Anto.: Anthocyanin, Light condition: 3,500 Lux.

Anthocyanin의 생성은 명주기가 증가할수록 촉진되는 경향을 나타내었다(Table 4). 이상의 결과를 종합하여 볼 때 인삼모상근에서 색소의 합성에 적절한 광도는 3,500 lux이며, 청색파장이 엽록소의 합성 및 carotenoid의 생성에 영향을 주는 것으로 나타났다. 엽록소 a 와 b의 비율을 고찰해 볼 때 암상태가 짧아지고 명상태가 증가할수록 엽록소 a의 함량은 감소하고 엽록소 b의 생성이 증가하는 것으로 산출되었다. 이러한 결과는 장시간의 광상태에서 엽록소 a의 합성이 먼저 일정수준 도달한 뒤 엽록소 b의 생성이 촉진됨을 유추할 수 있다.

요 약

인삼모상근의 색소합성과 엽록체 발달에 미치는 광의 효과를 조사하였다. 광도가 증가함에 따라 엽록소 및 carotenoids의 생성은 3,500 lux까지 증가하였으며, 7,000 lux에서 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. Anthocyanin의 생성은 7,000 lux까지 광도가 증가할수록 비례하여 증가하였다. 암상태에서 인삼모상근의 엽록체는 thylakoid membrane이 전혀 발달되지 않은 전색소체 형태 였으나 광도가 증가함에

따라 thylakoid membrane이 발달하였다. 1,000 lux 처리구에서 thylakoid membrane이 stack된 형태가 나타나기 시작하였으며, 3,500 lux 처리구에서 완전한 형태의 thylakoid membrane으로 발달되었다. 하지만 7,000 lux 처리구에서는 3,500 lux 처리구 보다 thylakoid membrane의 발달이 억제된 현상을 나타내었다. 청색파장에서 전체 엽록소의 함량은 백색광(3,500 lux)의 40% 정도까지 생성되었다. 광상태에서 sucrose 농도에 따른 엽록소와 carotenoid의 생성은 3% sucrose 처리구에서 양호하였으며, anthocyanin의 생성은 4% sucrose 처리구에서 가장 높게 나타났다. 명암주기에 의한 엽록소와 carotenoid의 생성은 암상태에서 1주간 배양한 후 4주동안 광상태에서 배양한 처리구에서 높았으며, anthocyanin의 생성은 광주기가 증가할수록 촉진되었다. 따라서 엽록체가 잘 발달된 인삼 모상근 배양에서 ginsenosides을 생산하고자 할 때는 적절한 파장 및 명암주기를 조절하는 것이 바람직하다고 생각된다

인 용 문 헌

1. Shibata, S., Tanaka, O., Sado, M., Tsushima, S.

- and Ohsawa, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 595 (1966).
2. Shibata, S. : *Proceedings of International Ginseng Symposium*, the Central Reserch Institute, Office of Monopoly, Seoul Korea, 69 (1974).
 3. Takagi, K. : *Proceedings of International Ginseng Symposium*, the Central Reserch Institute, Office of Monopoly, Seoul Korea, 119 (1974).
 4. Lee, J. S., Ko, K. M., Ahn, J. C., Bai, D. G., Park, K. Y., Ko, S. R. and Hwang, Baik. : *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 157 (1994).
 5. Ko, K. S., Heo, I. O., Koh, J. S., and Lee, W. J. : *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 263 (1990).
 6. Hwang, B. and Ko, K. M. : *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **4**, 288 (1989).
 7. Han, B. H., Park, Y. N., Han Y. N. and Shin, S. C. : *Ann. Rep. Nat. Res. Ins. Korea*, 73 (1984).
 8. Kim, M. W., Choi, K. J., Cho, M. H. and Hong, S. K. : *J. Korean Agri. Chem. Soc.*, **23**, 173 (1980).
 9. Tagaki, K., Saito, H. and Nabata, H. : *Jap. J. Pharmacol.* **22**, 245 (1972).
 10. Shim, S. C. and Chang, S. K. : *Bull. Korean Chem. Soc.*, **8**, 272 (1987).
 11. Matsunga, M., Katano, M., Yamamoto, H., Mori, M. and Tagata, K., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1279 (1989).
 12. Okamura, N., Kobayashi, K., Akaike, A. and Yagi, A. : *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 270 (1994).
 13. Yang, D. C., Choi, H. Y., Kim, Y. H., Yun, K. Y. and Yang, D. C. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **20**, 318 (1996).
 14. Roebbelen, A. : *Experimenta zur Stoffwechsel-Physiologie der Pflanzen*, Gerog Thieme Verlag Stuttgart, (1976).
 15. Yang, D. C., Chae, Q., Lee, S. J., Kim, Y. H. and Kang, Y. H. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**, 57 (1990).
 16. Yang, D. C., Kim, M. W., Lee, S. J., and Yun, K. Y. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **15**, 139 (1990).
 17. Beggs, C. J. and Wellmann, F. : *Photochem. Photobiol.*, **41**, 481 (1985).
 18. Michael, G. and Gerhard, R. : *Plant Cell Reports*, **1**, 288 (1982).
 19. Chandler, M. T., Marsac, N. T. and Kouchkovsky, Y. : *Can. J. Bot.*, **50**, 2285 (1972).