

해너콩(*Canavalia lineata*) 잎 칼루스의 유도와 유리 아미노산의 분석

黃仁杜·高碩贊*·權寧命

(서울대학교 자연과학대학 생물학과, *제주대학교 자연과학대학 생물학과)

Induction and Free Amino Acid Analysis of Callus from *Canavalia lineata* Leaf

Hwang, In Doo, Suck Chan Koh* and Young Myung Kwon

(Department of Biology, Seoul National University, Seoul and

*Department of Biology, Cheju National University, Cheju)

ABSTRACT

The callus of *Canavalia lineata* was induced from leaf tissues in MS medium supplemented with 10^{-5} M kinetin and 10^{-6} M IAA and was subcultured in Miller's medium supplemented with 10^{-5} M BAP and 10^{-6} M 2,4-D. When free amino acids of callus were analysed by HPLC, canavanine was not detected in the callus cultured either in the dark or light. But exogenously supplied canavanine was accumulated or consumed in the callus of *Canavalia lineata*.

서 론

제주도에 자생하는 해너콩(*Canavalia lineata*)은 비단백질성 아미노산인 canavanine을 함유하고 있으며, canavanine은 발아와 유식물의 생장에 있어 자연내에서는 물론 잎과 뿌리로 이동되어 분해된 후 주로 질소원으로 생장에 이용되는 것으로 보고된 바 있다(Rosenthal, 1970; Kwon *et al.*, 1986). Canavanine은 arginine의 guanidino-oxy구조 유사체로서 여러 생물에 대해 생장, 분화 및 발생 등 전반적인 대사 저해 효과를 갖는다고 알려져 있다(Rosenthal, 1977). 또한, canavanine은 arginine의 생합성 경로와 같은 Krebs-Henseleit ornithine-urea cycle을 통해 합성되며 이에 관하여는 효소들이 검출된 바 있다(Rosenthal and Naylor, 1969; Shargool and Cossins, 1969; Shargool, 1971).

식물체에서 canavanine 합성에 관한 연구가 많지 않으나, 최근에 자엽이 탈락된 해너콩의 잎, 뿌리, 도관액에서 canavanine이 검출되어 영양생장기간에도 canavanine이 뿌리에서 합성된다는 사실이 제시된 바 있을 뿐 아니라(Park and Kwon, 1990), 잎세포에서 canavanine은 주로 액포에 축적되는 것으로 알려져 있다(Yu, 1991). 그러나 식물체

에서 canavanine 합성에 관한 연구에서는 아직 확실한 결과를 얻고 있지 못한 실정이다(Rosenthal, 1982). 따라서, 본 실험에서는 해너콩으로부터 칼루스를 유도하여 이의 최적 생장조건을 확립하고, 여기에서 canavanine 함량을 분석하여 canavanine의 생합성 연구에 이용할 수 있는 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료. 제주도 토끼섬 일대의 자생지에서 채취한 해너콩(*Canavalia lineata*) 종자를 발아시켜 4000-5000 lux의 빛으로 하루 16시간씩 조사하면서 Hoagland 용액을 사용하여 27°C에서 1달 이상 생장한 것의 잎을 시료로 사용하였다.

칼루스 유도. Murashige와 Skoog(1962)의 기본염류에 30 g/l의 sucrose, 100 mg/l의 myo-inositol, 0.1 mg/l의 thiamine · HCl, 0.5 mg/l의 nicotinic acid 및 0.5 mg/l의 pyridoxine · HCl을 첨가하고 1 N KOH를 사용하여 pH를 5.7로 조정한 후 여기에 agar(Difco-Bacto)를 0.8%(w/v)되게 첨가한 배지에 잎의 절편을 심어 27°C 암소에서 칼루스를 유도하였다. 잎은 1% sodium hypochlorite에 15분간 표면 살균한 후 멸균 증류수로 수회 세척하여 사용하였다.

본 연구는 한국과학재단 연구비 지원의 일부로 수행된 것임.

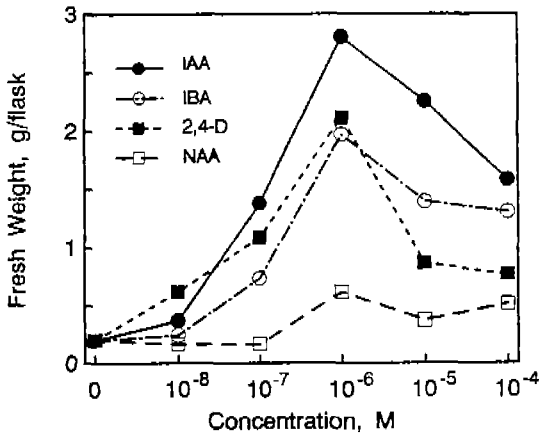


Fig. 1. Effect of IAA, IBA, 2,4-D and NAA on the growth of callus when kinetin concentration was 10^{-5} M. Growth was determined after 28 day culture.

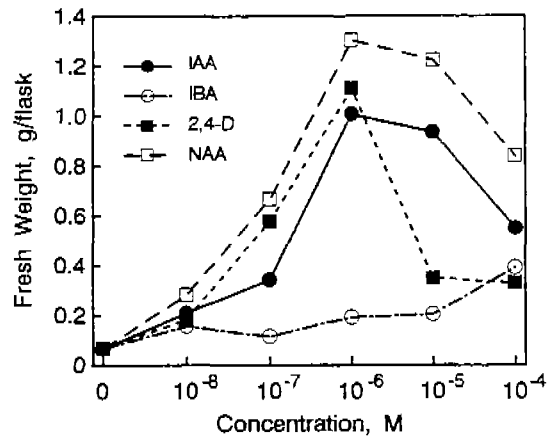


Fig. 2. Effect of IAA, IBA, 2,4-D and NAA on the growth of callus when BAP concentration was 10^{-5} M. Growth was determined after 28 day culture.

칼루스의 배양. 유도된 칼루스는 $Cu(NO_3)_2$ 와 $(NH_4)_2Mo_7O_{21}$ 가 제거된 Miller배지(Krasnuk *et al.*, 1971)에 0.8%의 agar를 첨가한 배지에 옮겨 27°C 암소에서 계대배양하였다.

칼루스의 canavanine 함량 측정. 칼루스의 canavanine 함량은 pentacyanoammonioferrate(PCAF) 발색법에 의해 발색시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였으며(Rosenthal, 1976), L-canavanine sulfate로 얻은 표준곡선에 대입하여 canavanine 함량을 산출하였다.

HPLC(high performance liquid chromatography)에 의한 아미노산 분석. 칼루스에 함유된 유리 아미노산의 분석은 Heinrikson과 Meredith(1984) 및 Ebert(1986), Lavi와 Holcenberg(1986)의 방법을 기초로 하여 분석하였다. Phenylisothiocyanate(PITC)와 아미노산을 반응시켜 phenylthiocarbamyl 유도체를 제조하고, reverse-phase HPLC를 시행하여 분리하였다. HPLC에 의한 분석과정은 Seferiadis 등(1987)의 방법을 기초로 하여 시행하였으며 분석 시스템은 2개의 model 110 A pump와 model 420 NEC controller, model 210 A system organizer 및 model 166 programmable detector module로 이루어진 Beckman model 338 conventional gradient system이었다. Column은 Beckman ultrasphere ODS C_{18} precolumn (5 μ m, 4×45 mm)과 Waters NovaPack ODS RP C_{18} column (4 μ m, 3.9×150 mm)을 사용하였고, peak는 model 427 computing integrator(Beckman)로 기록하고 integration하였다. 아미노산의 용출은 Park과 Kwon(1990)의 방법에 따라 수행하였으며 모든 용매는 HPLC grade를 사용하였다.

결과 및 고찰

해너콩(*Canavalia lineata*)의 유식물로부터 채취한 잎 절편을 Murashige-Skoog(MS) 배지에서 배양하여 칼루스를 유도하였다. 먼저, 칼루스 유도에 가장 큰 활성을 나타내는 오옥신의 영향을 알기 위하여 10^{-5} M kinetin과 10^{-6} M BAP(6-benzylaminopurine)에 오옥신으로 IAA(indole-3-acetic acid), IBA(indole-3-butyric acid), 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA(1-naphtaleneacetic acid)를 농도별로 처리하여 칼루스를 유도하였다(Figs. 1 and 2). 그 결과 10^{-5} M kinetin과 10^{-6} M IAA를 함께 처리하였을 때, 그리고 10^{-5} M BAP와 10^{-6} M NAA를 동시에 처리하였을 때 칼루스 유도가 잘 이루어졌다. 특히, 10^{-5} M kinetin과 10^{-6} M IAA를 함께 첨가할 때 칼루스 유도가 가장 잘 되어, 28일째의 칼루스 생체량이 2.8 g/flask에 달하였고 연노랑색을 띠는 부드러운 조직으로 발달하였다. 위의 실험에서 호르몬의 효과를 비교해볼 때, 시토키닌원으로 kinetin을 처리한 경우에 칼루스 유도가 잘 되었고, 칼루스의 색도 연노랑색을 띠고 부드러웠다. 반면에 BAP 처리구는 칼루스 유도율이 낮고 칼루스의 갈변화도 많은 것으로 나타났다. 한편, 10^{-6} M IAA와 함께 kinetin과 BAP를 농도별로 처리하여 칼루스 유도에 미치는 영향을 조사한 바 10^{-5} M kinetin 처리시 칼루스 유도가 가장 잘 이루어졌으며(data not shown), 이는 Fig. 1에서의 결과와 같은 것이었다. 이로써 MS 배지에서 해너콩의 칼루스 유도는 10^{-5} M kinetin과 10^{-6} M IAA를 동시에 처리하였을 때가 최적 조건임을 알 수 있었다.

한편, MS 배지 뿐만 아니라, Linsmaier-Skoog(LS) 배지(Linsmaier and Skoog, 1965)와 Miller 배지(Krasnuk *et al.*, 1971)에서 해너콩의 칼루스 유도 효과를 알기 위해서 10^{-5} M의 시토키닌과 10^{-6} M의 오옥신을 처리하여 그 생

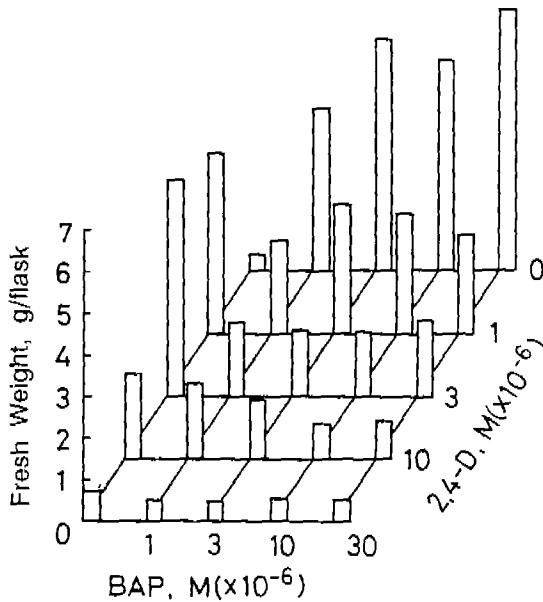


Fig. 4. Growth of callus as fresh weight with different combinations and concentrations of BAP and 2,4-D after 28 day culture.

리하였을 경우에는 비록 생장량은 좋았으나 육안으로 정상상태라 할 수 없는 수분함량이 지나치게 많은 것 같았고, 그 색깔 또한 약간 갈변화되어 있어 지속적으로 재배양하기에는 좋은 조건이 아니라 판단되었기에, 본 실험에서는 칼루스가 연노랑색을 띠며 부드러운 상태를 나타내는 10^{-5} M BAP와 10^{-6} M 2,4-D가 첨가된 Miller 배지에서 칼루스를 유지하였다.

해너콩은 종자 뿐만 아니라 잎, 뿌리, 도관역에서도 canavanine이 존재하는 것으로 알려져 있어(Kwon *et al.*, 1986; Park and Kwon, 1990), 그 일로부터 유도된 칼루스에서도 canavanine이 검출되는지를 조사하였다. 그 결과 10^{-5} M BAP와 10^{-6} M 2,4-D가 처리된 Miller 배지에서 배양한 칼루스에서는 canavanine이 PCAF 발색법에 의해서는 극미량에 존재하는 것으로 계산되었다. 한편, 칼루스의 재분화로 canavanine의 생합성이 회복되는지를 알아보기 위하여 칼루스를 재분화시키는 실험 중 칼루스의 greening이 일어났기에(Fig. 5) 이것의 canavanine 함량을 PCAF 발색법에 의해 각각 측정하였다. 조명하에서 칼루스를 배양한 경우 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M의 BAP와 10^{-6} M과 5×10^{-7} M의 2,4-D나 NAA를 처리하였을 때 칼루스의 greening과 생장이 잘 이루어졌다. 그외의 호르몬 처리구에서는 칼루스가 greening되지 않거나 자라지 않고 갈변화되는 현상을 보였다.

PCAF 발색법에 의해 칼루스의 canavanine 함량을 측



Fig. 5. The calli were cultured for 28 days in the dark (left) and light (right) on Miller's medium supplemented with 10^{-5} M BAP and 10^{-6} M 2,4-D. Arrows indicate green spots.

정한 결과 greening된 칼루스가 greening되지 않은 것보다 1.6-2.0배가 많은 것으로 나타났으나 이러한 함량의 산출은 분광학적 측정치가 최저 한계치 범위에 들어 있는 것으로부터 얻어진 것이어서, 보다 정확한 내용을 알아보기 위하여 HPLC에 의한 유리 아미노산의 조성 패턴을 분석 비교하였다(Table 2). 그러나 어느 조건의 칼루스에서도 canavanine은 검출되지 않았다. 따라서, greening된 칼루스에서 canavanine의 함량이 보다 높은 것처럼 나타난 것은 PCAF 발색법에 대한 간섭물질의 존재 때문으로 추정되었다.

Table 2에서 보면, 암소에서 배양한 칼루스에서는 arginine과 asparagine의 상대적인 함량비가 높은 반면, 조명하에서 배양한 칼루스에서는 arginine의 비율이 감소하고 asparagine의 비율은 보다 높아졌음을 알 수 있다. 이러한 차이에 대한 내용은 본 결과만으로 알 수는 없으나 빛에 의하여 칼루스에서 아미노산 대사의 변화가 일어난 결과일 것으로 해석된다. 그리고 arginine과 canavanine은 Krebs-Henseleit ornithine-urea cycle에서 합성되는 것으로 알려져 있는데(Rosenthal, 1982), 이러한 관점에서 볼 때 칼루스에 상당량의 arginine이 존재함에도 불구하고 canavanine이 검출되지 않은 것은 canavanine의 생합성이 보다 초기 단계에서 저해된 것으로 추정되며, 한편 canavanine이 canaline의 transamidation 과정을 거쳐서 합성되는 것이라면(Rosenthal *et al.*, 1988) 본 결과만으로는 그 이유를 추정할 수 없다.

이와 같이 해너콩의 칼루스에서는 canavanine이 존재하지 않음이 확실하기에 이러한 칼루스가 외부에서 공급한 canavanine을 흡수 측정할 수 있는지를 조사하였다. 10^{-3} M의 canavanine을 Miller 배지에 첨가하여 칼루스를 3일

Table 1. Effect of auxin and cytokinin on the growth of callus in MS, LS, and Miller's medium

Medium	Cytokinin (10^{-5} M)	Auxin (10^{-6} M)			
		IAA	IBA	2,4-D	NAA
		Fresh weight (g/flask)			
MS		2.805 ± 0.249	1.966 ± 0.060	2.112 ± 0.404	0.613 ± 0.033
LS	Kinetin	0.460 ± 0.040	0.105 ± 0.005	2.180 ± 0.020	0.676 ± 0.135
Miller		0.770 ± 0.020	0.485 ± 0.015	1.365 ± 0.020	1.610 ± 0.085
MS		1.008 ± 0.065	0.193 ± 0.081	1.111 ± 0.047	1.303 ± 0.039
LS	BAP	1.155 ± 0.015	0.580 ± 0.060	2.045 ± 0.165	2.220 ± 0.080
Miller		1.076 ± 0.302	0.755 ± 0.005	1.095 ± 0.065	1.615 ± 0.045

Growth was determined after 28 day culture.

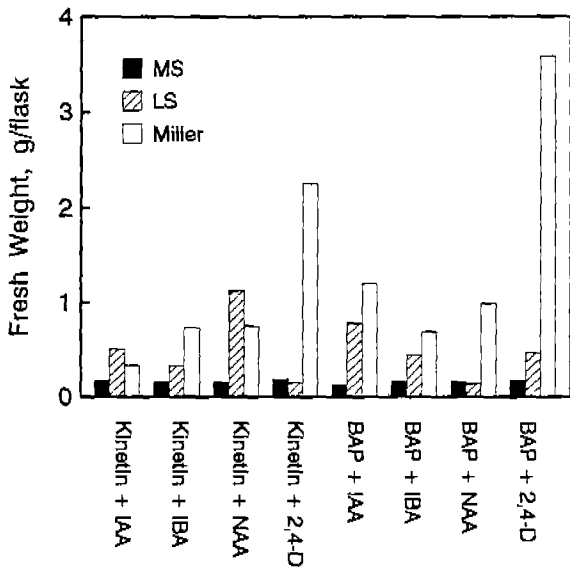


Fig. 3. Growth of callus as fresh weight with different combinations of auxin (10^{-6} M) and cytokinin (10^{-5} M) in MS, LS, and Miller's medium after 28 day culture.

제량을 측정하였다(Table 1). 그 결과 10^{-5} M kinetin과 10^{-6} M IAA를 첨가한 MS 배지에서 칼루스의 생장이 가장 촉진되었고, 칼루스는 연노랑색을 띠었으며 부드러운 편이었다. 반면에 LS 및 Miller 배지에서 각각 유도된 칼루스는 전반적으로 생장이 느리고 쉽게 갈변되었다.

이와 같은 결과들(Figs. 1 and 2, Table 1)로 보아 해너콩 잎으로부터 칼루스의 유도는 MS 배지에 10^{-5} M kinetin과 10^{-6} M IAA를 동시에 첨가하였을 때 가장 잘 이루어짐을 알 수 있었다. 또, 해너콩의 잎 뿐만 아니라 줄기, 하배축, 뿌리 등에서도 MS 배지에 10^{-5} M kinetin과 10^{-6} M IAA를 함께 처리하였을 때 칼루스 유도가 잘 이루어졌다. 따라서 해너콩의 칼루스 유도에 있어 배지로는 MS 배지가, 그리고 호르몬으로는 kinetin과 IAA가 적정함을 알 수 있었다.

MS 배지에서 유도된 칼루스를 계대 배양할 때의 최적 조건을 알기 위하여 시토키닌원으로 kinetin과 BAP를 옥신원으로 IAA, IBA, 2,4-D, NAA를 함유한 MS, LS, Miller 배지에 계대하여 그 생체량을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 10^{-5} M BAP와 10^{-6} M 2,4-D를 처리한 Miller 배지에서 칼루스의 생장이 가장 촉진되어 많은 생체량의 증가를 보임과 동시에 연노랑색을 띠었으며 부드러운 편이었다. 그외의 다른 처리구에서는 생체량의 증가도 미미하고 칼루스가 갈변되는 현상을 보였다. 한편, 해너콩과 같은 *Canavalia* 속에 속하는 jackbean(*Canavalia ensiformis*)의 경우 호르몬으로 0.4 mg/l NAA와 0.25 mg/l kinetin을 첨가한 Miller 배지에서 칼루스를 유도하여 계대배양한 바 있다(Gustine and Sherwood, 1978). 또, LS 배지에 호르몬으로 5 mg/l NAA와 10 mg/l BAP를 첨가하여 jackbean의 칼루스를 배양한 보고도 있다(Vazquez-Flota et al., 1989). 그러나 본 실험 결과 해너콩은 jackbean과는 달리 칼루스 유도는 호르몬에서 10^{-5} M kinetin과 10^{-6} M IAA가 포함된 MS 배지에서, 계대배양은 10^{-5} M BAP와 10^{-6} M 2,4-D가 첨가된 Miller 배지에서 잘 이루어졌다. 이와 같은 실험상의 차이는 종이 서로 다르기 때문인지 아니면 또 다른 이유에 의한 것인지 알 수 없으나 해너콩 잎으로부터 유도된 칼루스를 안정된 세포주로서 유지할 수 있는 방법이 확립된 것은 확실하다.

다음에는 해너콩 잎으로부터 유도된 칼루스를 BAP와 2,4-D가 농도별로 처리된 Miller 배지에 배양한 후 생체량의 변화를 측정하여 그 영향을 조사하였다(Fig. 4). 그 결과 BAP와 2,4-D를 각각 단독으로 처리하였을 때 생체량이 증가하는 경향을 나타냈다. BAP의 경우에는 3×10^{-5} M에서 최대치를 보였으며, 2,4-D의 경우에는 3×10^{-6} M에서 최대치에 이르고 그보다 높은 농도에서는 저해효과를 보였다. BAP와 2,4-D를 혼합하여 처리하였을 때에는 3×10^{-5} M BAP와 10^{-6} M 2,4-D를 첨가한 경우에 최대 성장을 나타냈으나 3×10^{-5} M BAP만을 처리하였을 때의 약 50%에 지나지 않았다. 그러나 BAP나 2,4-D를 단독으로 처

Table 2. Relative proportions of free amino acids analysed by HPLC in the callus grown in the dark and light conditions

Amino acids	Area (%)	
	Dark	Light
Asp	3.179	2.799
Glu	5.639	3.585
Ser	5.584	4.491
Gly	1.029	0.855
Asn	19.026	36.930
Gln	4.464	5.352
His	2.649	1.826
Thr+Ala	13.810	12.745
Can*	-	-
Arg	21.094	11.682
Pro	2.570	4.062
Tyr+Val	3.341	3.243
Met	0.134	0.203
Ile	0.932	0.840
Leu	1.710	1.752
Cys	0.733	0.261
Phe	1.694	0.954
Lys	0.866	0.748
Others	11.365	7.639
Total	100	100

Can*: canavanine.

간 배양한 것과 10 mM MES(2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)-KOH 완충용액 (pH 5.5)에 6시간 처리한 것의 유리 아미노산 조성 패턴을 HPLC로 분석하였다 (Table 3). 그 결과, 두 경우 모두에서 canavanine 함량 비율이 비교적 높은 것으로 나타났다. 따라서, canavanine이 칼루스에서 검출되지 않은 것은 (Table 2) canavanine이 세포내에서 축적될 수 없거나 보다 신속하게 분해된 결과라기 보다는 칼루스에서 합성되지 않았기 때문으로 해석할 수 있을 것 같다. 그리고 Table 3의 실험에서 Miller 배지에 칼루스 2g을 3일간 배양한 경우 배양액 40 ml에 40 μ mole의 canavanine을 첨가하였는데, 배양이 끝난 후에는 칼루스에 1.860 μ mole, 배양액에는 6.814 μ mole의 canavanine이 검출되었다. 또 완충용액 20 ml에는 20 μ mole의 canavanine을 첨가하였던 바, 6시간 후에는 칼루스 2g에 1.828 μ mole, 완충용액에서는 9.828 μ mole의 canavanine이 남아있었다. 이러한 결과로 보아 본 칼루스는 canavanine을 생물물질로 이용하고 있음을 알 수 있다. 그런데 본 칼루스의 유리 아미노산 조성에 있어 canavanine의 존재비가 뿌리나 잎조직의 경우보다 적은 것으로 나타났는데 (Park and Kwon, 1990), 이에 대한 내용은 알 수 없다. 한편,

Table 3. Relative proportions of free amino acids analysed by HPLC in the calli grown in Miller's medium (containing 10^{-3} M canavanine) for 3 days and in those treated with 10 mM MES-KOH buffer (containing 10^{-3} M canavanine), pH 5.5 for 6 h

Amino acids	Area (%)	
	Miller's medium	MES-KOH buffer
Asp	1.792	1.089
Glu	4.082	1.869
Ser	4.423	4.237
Gly	0.749	0.707
Asn	4.501	12.313
Gln	15.211	6.258
Thr+Ala	12.420	4.968
Can*	6.880	5.662
Arg	12.189	12.602
Pro	3.986	2.250
Tyr+Val	3.353	3.149
Met	0.455	0.298
Ile	2.154	6.841
Leu	0.757	0.783
Cys	2.418	3.393
Phe	3.378	5.450
Lys	0.105	0.371
Others	20.697	28.025
Total	100	100

Can*: canavanine.

Table 2에서 암소에서 배양된 칼루스와 Table 3에서 canavanine을 첨가하여 배양된 칼루스를 비교해 볼 때 유리 아미노산 조성의 패턴이 크게 변한 것으로 보아 첨가한 canavanine의 효과가 컸음을 알 수 있으며, 이는 탈분화된 조직이어서 그 변화가 더욱 컸을 것이라 사료된다.

지금까지 본 실험에서는 해너봉 잎으로부터 칼루스를 유도하여 최적 배양 조건을 확립하였고, 안정된 세포주를 확보하였다. 그리고 본 칼루스가 canavanine을 합성하지는 못하나 축적하고 이용할 수 있음을 알았다. 그러므로 재분화를 유도하는 실험과 함께 본 칼루스는 canavanine의 대사를 연구하는데 좋은 재료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

해너봉(*Canavalia lineata*) 잎의 칼루스 유도는 10^{-5} M kinetin과 10^{-6} M IAA가 첨가된 MS 배지에서, 계대배양은 10^{-5} M BAP와 10^{-6} M, 2,4-D가 포함된 Miller 배지에서 잘 이루어졌다. HPLC에 의한 유리 아미노산 분석 결과,

해너콩 칼루스에서 canavanine이 검출되지 않았고, 빛 아래에서 greening된 칼루스에도 역시 canavanine이 존재하지 않았다. 그러나, 칼루스는 외부에서 공급한 canavanine을 조직내에 축적하고 대사할 수는 있었다

참 고 문 헌

- Ebert, R.F. 1986. Amino acid analysis by HPLC: Optimized conditions for chromatography of phenylthiocarbonyl derivatives. *Anal. Biochem.* **154**: 431-435.
- Gustine, C.L. and R.T. Sherwood. 1978. Regulation of phytoalexin synthesis in jackbean callus cultures. *Plant Physiol.* **61**: 226-230.
- Heinrikson, R.L. and S.C. Meredith. 1984. Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* **136**: 65-74.
- Krasnuk, M., F. J. Witham and J.R. Tegley. 1971. Cytokinins extracted from pinto bean fruit. *Plant Physiol.* **48**: 320-324.
- Kwon, Y.M., H.C. Chung, S.C. Koh and Y.N. Hong. 1986. On utilization of canavanine and activity of canavanine during germination and growth of *Canavalia lineata* (L.) DC. *Korean J. Bot.* **29**: 85-94.
- Lavi, L.E. and J.S. Holcenberg. 1986. Sensitive analysis of asparagine and glutamine in physiological fluids and cells by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Chrom.* **377**: 155-163.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **76**: 1019-1023.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Park, K.S. and Y.M. Kwon. 1990. The analysis of canavanine content in leaves, roots, and xylem exudate of *Canavalia lineata*. *Korean J. Bot.* **33**: 119-126.
- Rosenthal, G.A. 1970. Investigation of canavanine biochemistry in the jack bean plant, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Plant Physiol.* **46**: 273-276.
- Rosenthal, G.A. 1976. Preparation and colorimetric analysis of L-canavanine. *Anal. Biochem.* **77**: 147-151.
- Rosenthal, G.A. 1977. The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. *Q. Rev. Biol.* **52**: 155-178.
- Rosenthal, G.A. 1982. L-canavanine metabolism in jackbean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Plant Physiol.* **69**: 1066-1069.
- Rosenthal, G.A. and A.W. Naylor. 1969. Purification and general properties of arginosuccinic acid lyase from jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Biochem. J.* **112**: 415-419.
- Rosenthal, G.A., M.A. Berge, A.J. Ozinskas and C.G. Hughes. 1988. Ability of L-canavanine to support nitrogen metabolism in the jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *J. Agric. Food Chem.* **36**: 1159-1163.
- Shargool, P.D. 1971. Purification of arginosuccinate synthetase from cotyledons of germinating peas. *Phytochemistry* **10**: 2029-2032.
- Shargool, P.D. and E.A. Cossins. 1969. Further studies of L-arginine biosynthesis in germinating pea seeds. *Can. J. Biochem.* **47**: 467-475.
- Vazquez-Flota, F., J. Quiroz, K.N. Scorer and V.M. Loyola-Vargas. 1989. Effect of the auxin/cytokinin ratio on the enzymes of nitrogen metabolism in *Canavalia ensiformis* L. tissue cultures. *J. Plant Physiol.* **135**: 57-62.
- Yu, K.H. 1991. Characterization of arginase and subcellular distribution of canavanine in *Canavalia lineata*. Ph. D. Thesis. Seoul National University, Seoul.

(1991. 7. 12 接受)