

## 제라늄(*Pelargonium graveolense*) 캘러스의 재분화 및 peroxidase isozyme 발현패턴 변화

이석현 · 이미영\*

순천향대 생명과학부

**초 록** : 방향성 제라늄(*Pelargonium graveolense*)의 옆병을 취하여 여러 가지 농도의 식물생장조절제가 포함된 MS 배지에서 캘러스를 유도하였다. 2 mg/l NAA와 0.5 mg/l BAP가 함유된 MS배지와 2 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BAP가 함유된 MS배지에서 최대 70% 이상의 캘러스가 유도되었으나, 2,4-D나 NAA 혹은 BAP 단독 처리군에서는 캘러스가 유도되지 않았다. 유도된 캘러스를 0.05 mg/l NAA와 0.5 mg/l BAP가 처리된 MS배지로 옮겨서 약 5주 후 캘러스당 최대 14개의 싹이 유도되었고, 이를 호르몬이 포함되지 않은 발근유도 배지로 옮겨서 약 3주간 배양했을 때 최대의 뿌리가 유도되었다. 호르몬 조성에 따른 제라늄 캘러스의 peroxidase(POD) 활성변화를 조사했을 때 NAA와 BAP 처리군이 2,4-D와 BAP 처리군보다 전 배양기간동안 높은 POD 비활성을 나타내었다. 호르몬조성에 따른 POD isozyme의 발현양상을 비교해 보면 cathodic POD의 경우는 NAA와 BAP 처리군에서 주로 POD C3가 발현되었으나 2,4-D와 BAP 처리군에서는 주로 POD C1이 발현되었다. Anodic POD의 경우 POD A1, A2와 A3가 이 두 호르몬 처리군에서 모두 비슷한 수준으로 발현하였다. (2000년 6월 14일 접수, 2000년 7월 15일 수리)

### 서 론

식물 peroxidase(POD, E.C.1.11.1.7)는 indole-3-acetic acid의 산화, 환원형 pyridoxal과 관련된 화합물의 산화, methional의 ethylene으로의 전환, guaiacol, o-dianisidine, scopoletin과 esculetin 등 phenolic 화합물들의 산화, lignification 및 세포벽 합성, 엽록체 분해, polysaccharide cross-linking, extensin monomer의 cross-linking, 병원체에 대한 방어등 여러 가지 다양한 반응에 참여한다.<sup>1,3)</sup> 이러한 기능상의 다양성과 함께 POD는 세포의 성장과 분화를 조절하는 효소로서<sup>4)</sup> isozyme pattern이 세포의 성장과 노화, 환경조건 등에 따라서 변화하기 때문에 어느 특수조건에서의 POD isozyme의 pattern변화를 생리생화학적인 기능과 연결시키고자 하는 노력이 많이 시도되었다.<sup>5)</sup> 최근 특정시기 식물세포의 분화와 POD 생성을 연결시켜 보려는 노력이 있었을 뿐만 아니라, 특정 POD isozyme의 활성변화가 식물의 성장과 분화과정에 따라 다르게 나타나므로 식물의 분화와 발달단계에서 개별 POD isozyme이 서로 다르게 조절되고 생합성될 가능성이 제시되었다.<sup>6)</sup> Horseradish,<sup>7)</sup> Korean radish,<sup>8-12)</sup> Japanese radish,<sup>13)</sup> 담배<sup>14)</sup>와 고구마<sup>15,16)</sup> 등 다양한 식물에서 POD가 정제되어 효소학적 특성이 규명되어 왔고, 유전자구조와 기능이 밝혀지고 있다.

제라늄(*Pelargonium graveolense*)은 주 성분이 monoterpene인 방향성 정유를 생산하는 주요한 경제식물로서 정유의 함량 분석, 재배기술, 품종개량 등의 연구가 많이 수행되어 왔다.<sup>17)</sup> 특히 regal geranium과 zonal geranium의 경우 체세포 배발생을 통한 식물 재분화에 관한 연구가 광범위하게 진행되어 왔

나,<sup>18,19)</sup> 대부분 배발생 캘러스로부터의 배발생물이 낮아서 배발생 캘러스의 유도, 체세포 배발생 및 식물체 재분화과정에 배지조건의 변화가 요구되고 있다. 1997년 Saxena 등은 최초로 방향성 제라늄(*Pelargonium* sp. 'Frensham')의 체세포배발생에 의한 재분화를 유도하였고 이를 이용하여 *Agrobacterium* 매개의 형질전환시스템을 구축하게 되었다.<sup>20)</sup> 그러나 전반적으로 방향성 제라늄의 조직배양에 관한 연구 뿐만 분자수준에서의 종합적인 연구가 매우 미미한 실정이며 정유함성에 관련된 몇 효소를 제외하면 제라늄의 분화와 발달 및 성장에 관련된 효소수준에서의 연구가 거의 진행되어 있지 않다. 본 연구에서는 방향성 제라늄(*Pelargonium graveolense*)으로부터 캘러스를 유도한 후 호르몬 변화에 의한 POD isozyme의 발현변화를 조사하였다. 또한 캘러스를 재분화시킨후 재생식물과 캘러스사이의 POD 활성변화를 서로 비교하였다.

### 재료 및 방법

#### 식물재료

본 실험에서는 양재동 꽃시장에서 방향성 제라늄(*Pelargonium graveolens*)을 구입하여 미분화세포를 유도하고 이를 재분화시켜서 사용하였다.

#### 방향성 제라늄 캘러스의 유도 및 배양

양재 꽃시장에서 구입한 방향성 제라늄의 정아와 측아 및 옆병을 취해 무균상태에서 70%의 ethanol에서 1분, 50%의 Iox에서 20분 동안 진탕소독한 후 멸균된 증류수로 3~4회 씻어 주었다. 멸균된 정아와 측아 및 옆병을 각각 다양한 농도(0.5 mg/l-2 mg/l)의 naphthalene acetic acid(NAA)와 6-Benzylaminopurine(BAP)가 포함된 MS(Murashige and Skoog)배지 및

찾는말 : 방향성 제라늄, 캘러스, 재분화, peroxidase  
\*연락처 : Tel : 82-41-530-1355; Fax : 82-41-530-1350  
E-mail : miyoung@sch.ac.kr

2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)와 BAP가 포함된 MS배지에 옮긴 후 70% 습도와 25°C 성장상에서 캘러스유도를 시도하였다. 유도된 캘러스 중 배아세포 부분을 선택하여 0.8% agar가 첨가된 MS배지에 1주 간격으로 접종하였다. 이를 새로운 MS배지로 옮겨서 약 3-4주간 배양하였다.

### 캘러스의 재분화와 식물재생

유도된 캘러스를 0.05 mg/l NAA와 0.5 mg/l BAP가 포함된 MS배지로 옮긴 후 3-5주간 배양하여 싹(shoot)을 유도하였다. 캘러스에서 형성된 싹부분을 선택하여 발근유도배지인 호르몬이 포함되지 않은 MS배지로 옮긴 후 식물체 재분화를 유도하였다.

### 효소원의 준비

POD의 여러 가지 isozyme은 외부환경과 성장조건 및 조직별로 조직특이적 발현양상을 보이므로, 재분화된 방향성 제라늄의 POD 활성을 캘러스와 성숙한 제라늄의 POD 활성과 비교하였다. 효소액의 추출을 위하여 제라늄 잎 혹은 줄기 및 캘러스에 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6) 3 ml를 가한 후 파쇄하여 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 효소원으로 사용하였다.

### POD 활성도 측정 및 단백질 정량

POD의 활성은 guaiacol을 기질로 사용하여 470 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소 반응액은 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0), 150 mM guaiacol, 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 그리고 효소액을 포함하여 전체 부피가 1 ml가 되게 하였고 효소 반응은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하면서 시작하였다. POD 1 unit은 1분 동안 흡광도를 1 변하게 하는 효소의 양으로 정의하였다. 효소액의 단백질량은 Lowry 방법<sup>21)</sup>으로 측정하였으며 표준단백질은 bovine serum albumin을 사용하였다.

### Starch gel electrophoresis 및 활성염색

5 mM histidine buffer(pH 7.0)에 potato starch를 전체 용액에 11%되게 넣어 가열하여 녹인 후 4°C에서 5시간 이상 냉각하여 사용하였다. 0.41 M sodium citrate buffer(pH 7.0)를 bridge buffer로 사용하며 100 V에서 4시간동안 전계시켰으며 전개한 gel을 2등분하여 dimethylformamide 10 ml에 3-amino-9-ethylcarbazole 100 mg을 넣어 녹인 후 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.0) 185 ml를 넣고 100 mM CaCl<sub>2</sub> 10 ml를 넣은 후 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µl를 넣어 POD의 활성부위를 염색하였다.

## 결과 및 고찰

### 방향성 제라늄의 캘러스 유도

제라늄은 산업적으로 유용한 경제작물로서 regal geranium과 zonal geranium의 경우 체세포 배발생을 통한 식물 재분화에 관한 연구가 광범위하게 진행되어 왔다. 정단분열조직, 줄기 및 캘러스로부터 제라늄(*Pelargonium × hortum*)의 재분화가 보고되

**Table 1. Effect of plant growth regulators on callus induction from leaf petioles of scented-geranium**

Plant growth regulators (mg/l) <sup>a</sup>			Callus induction from petiole
2,4-D	NAA	BAP	
1	0	0.5	+
2	0	0.5	+++
0	1	0.5	++
0	2	0.5	+++
1	0	0	-
0	1	0	-
0	0	0.5	-

<sup>a</sup>Plant growth regulators were added in MS basal medium.

- : none.

+ : less than 30%.

++ : 30~70%.

+++ : more than 70%.

었고,<sup>22)</sup> 혼성종자 제라늄(*Pelargonium × hortum*)과 regal geranium(*Pelargonium × domesticum*)의 일차 캘러스로부터 싹의 재분화와 증식이 보고되었다.<sup>22,23)</sup> 뿐만 아니라 regal geranium의 체세포 배발생과 재분화에 관한 연구가 보고되어 있으나, 대부분 배발생 캘러스의 유도와 체세포 배발생 및 식물체 재분화의 빈도가 낮아서 배양조건의 변화가 요구되고 있다. Zonal geranium의 경우 하배축의 체세포 배발생률을 높이기 위하여 thidiazuron을 첨가했을 때 cytokinin 의존형 세포분화가 촉진됨이 보고 되었다.<sup>24)</sup> 그러나 방향성 제라늄의 경우 재분화와 조직배양에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 성숙한 방향성 제라늄의 정아, 측아 및 옆병을 취하여 여러 가지 농도의 식물생장조절제가 포함된 MS배지에서 캘러스를 유도하였다(Table 1). 그 결과 NAA/BAP의 비율이 2 mg/0.5 mg인 경우 옆병으로부터 최대 70% 이상의 캘러스가 유도되었고, 2,4-D/BAP의 비율이 2 mg/0.5 mg인 경우에도 캘러스가 70% 이상 유도되었다. NAA/BAP의 비율이 1 mg/0.5 mg인 경우 캘러스 유도율이 30~70%이었으나, 2,4-D/BAP의 비율이 1 mg/0.5 mg인 경우 캘러스 유도 비율이 30% 미만으로 감소하였다. 2,4-D, NAA 혹은 BAP 단독 처리에서는 캘러스가 전혀 유도되지 않았다. 따라서 방향성 제라늄 캘러스 유도에 가장 적당한 호르몬 조성은 2.0 mg/l NAA와 0.5 mg/l BAP 혹은 2.0 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BAP이었다. 각 호르몬 처리군의 캘러스유도에 걸리는 시간을 서로 비교해보면 NAA와 BAP 처리군과 2,4-D와 BAP 처리군의 경우 옆병과 정아로부터 약 4주 후 캘러스가 유도되었다. 이에 비해 2,4-D와 BAP 처리군의 경우 측아로부터 약 5주 후 캘러스가 유도되었으나 NAA와 BAP 처리된 측아로부터는 캘러스가 유도되지 않았다(결과 미제시).

### 방향성 제라늄 캘러스의 재분화유도

2.0 mg/l NAA와 0.5 mg/l BAP 처리군에서 유도된 1차 캘러스로부터 싹(shoot)을 유도하기 위하여 NAA와 BAP의 농도를 다양하게 변화시켰다. 그 결과 방향성 제라늄의 옆병으로부터 유도한 캘러스를 0.05 mg/l NAA와 0.5 mg/l BAP가 처리된 MS배지로 옮겼을 때 약 5주 후 캘러스당 최대 14개의 싹이

**Table 2. Effect of plant growth regulators on shoot formation from leaf petioles of scented-geranium**

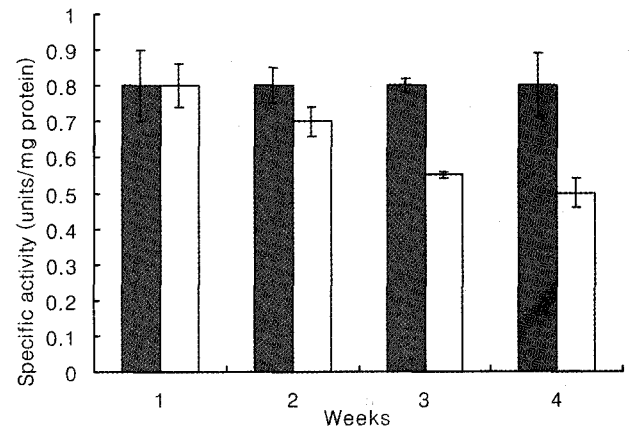
Plant growth regulators (mg/l) <sup>a</sup>		Number of shoots per callus <sup>b</sup>
NAA	BAP	
0	0.5	0
0.01	0.5	2±0.1
0.03	0.5	6.7±0.4
0.05	0.5	14±0.6
0.07	0.5	5.9±0.7
0.1	0.5	0

<sup>a</sup>Plant growth regulators were added in MS basal medium.

<sup>b</sup>Data are means ± S.E. of triple replications.

유도되었다(Table 2). 그러나 정아와 측아에서 유도된 캘러스로부터는 신초가 유도되지 않았다.

신근유도를 위하여 신초부위를 취한 후 호르몬이 포함되지 않은 발근유도배지로 옮겨서 약 3주간 배양했을 때 신근이 유도되었다. 그러나 액체 배지에서 배양시킨 캘러스에서는 신근 유도가 일어나지 않았다. 제라늄 조직배양의 문제점으로 지적되고 있는 낮은 재분화빈도를 높이기 위하여 adenine sulfate와 isopentenyl adenine을 배지에 첨가하였을 때 신초유도와 신초 증식이 증가하였다고 보고되어 있으며,<sup>25)</sup> Robichon 등은 제라늄 하배축을 thidiazuron를 첨가한 MS배지에서 배양했을 때 부정아유도가 활발하게 진행되어 95% 이상의 재분화가 일어났다고 보고한 바 있다.<sup>26)</sup> 그러나 본 연구에서는 NAA와 BAP의 호르몬 비율변화를 통하여 방향성 제라늄 캘러스를 유도시켰고

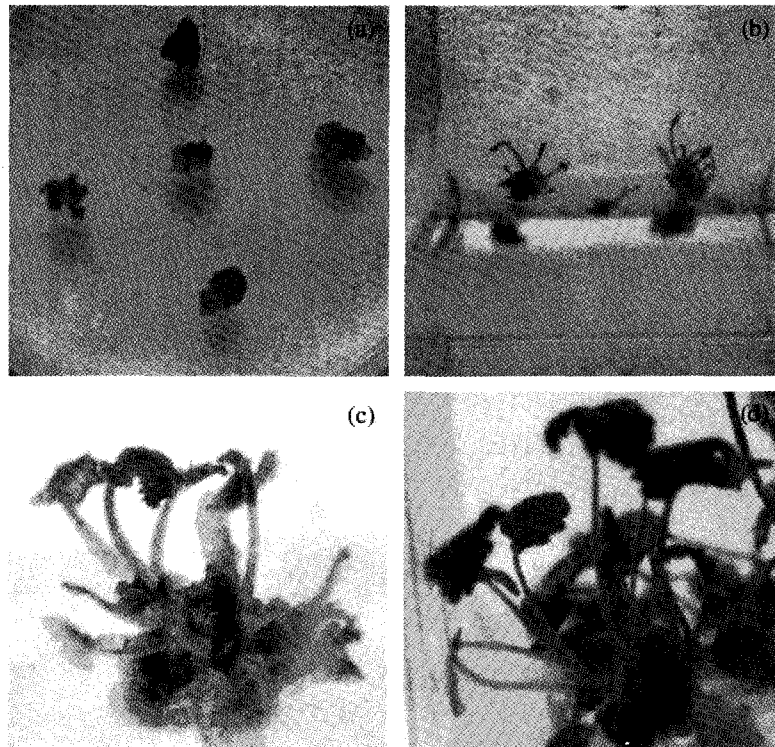


**Fig. 2. Changes of peroxidase specific activities in callus induced from geranium depending on plant growth regulators. ■: 2.0 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP, □: 2.0 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP.**

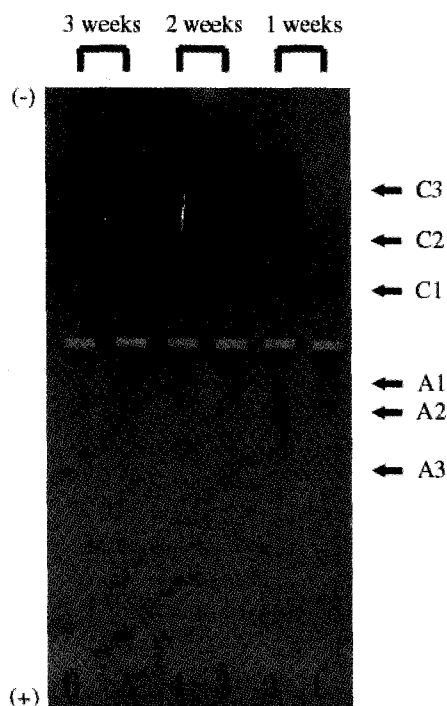
이로부터 효율적인 재분화를 가능하게 하였다(Fig. 1).

#### 호르몬 조성에 따른 POD isozyme 발현 비교

NAA와 BAP 처리군과 2,4-D와 BAP 처리군에서 유도된 캘러스의 POD 활성과 POD isozyme 패턴을 조사하여 호르몬 조성에 따른 isozyme 발현변화를 비교하였다. NAA와 BAP 처리 및 2,4-D와 BAP 처리된 캘러스의 POD 비활성(unit/mg protein)을 조사한 결과 총 배양기간동안 NAA와 BAP처리군이 2,4-D와 BAP처리군보다 높은 POD 비활성을 나타내었다. 배양



**Fig. 1. Callus induction and plant regeneration from scented-geranium (*Pelargonium graveolense*). (a) Calli induced from leaf petiole of scented-geranium, (b) Shoots induced from petiole-derived calli, (c) Further development of shoots, 4 weeks after transfer to fresh MS medium, (d) Regenerated plantlets of scented-geranium.**



**Fig. 3.** Changes of peroxidase isozyme patterns in callus cultures of geranium on MS media containing 2 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP, or 2 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP for 3 weeks. Lane 1, 3, 5: callus cultured on 2 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP; Lane 2, 4, 6: callus cultured on 2 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP.

기간에 따른 비활성도의 변화를 살펴보면, NAA와 BAP 처리군의 경우 배양 1주에서 4주 동안 POD의 비활성도가 거의 비슷하였으나, 2,4-D와 BAP 처리군에서는 배양기간이 1주에서 4주로 증가함에 따라 POD 비활성도가 현저하게 감소하였다 (Fig. 2).

제라늄 캘러스 효소원을 pH 7.0에서 starch gel electrophoresis를 수행한 결과 cathode로 이동하는 약 3개의 cathodic POD isozyme(C1, C2와 C3)와 anode로 이동하는 약 3개의 anodic POD isozyme(A1, A2와 A3)를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 호르몬 조성에 따른 POD isozyme의 발현양상을 비교해보면 anode로 이동하는 anodic POD isozyme A1, A2, A3는 NAA와 BAP배지와 2,4-D와 BAP 배지에서 비슷한 발현양상을 보였다. 이에 비해 cathode로 이동하는 cathodic POD isozyme의 발현양상은 서로 차이를 보였다. NAA와 BAP 배지에서는 다른 cathodic POD isozyme에 비해 far migrating POD isozyme C3가 과량 발현되었고, 2,4-D와 BAP 배지에서는 POD isozyme C2와 C3에 비해 low migrating anodic POD isozyme C1이 뚜렷이 발현되었다. 호르몬 조성에 따른 POD isozyme의 발현변화에 관한 연구를 살펴보면 담배 캘러스의 경우 신초형성시  $10^{-8}$  M kinetin배지에서 형성된 신초에서는 cathodic POD isozyme의 양이 증가한 반면  $10^{-5}$  M kinetin 배지에서 형성된 신초에서는 anodic POD isozyme의 양이 증가하였다. 뿐만 아니라  $10^{-5}$  M kinetin 배지에서 특히 과량 유도되는 anodic POD isozyme A3가 poly(A)+RNA 뿐만 아니라 poly(A)-RNA에서도 합성된다는 사실을 확인하였다.<sup>27)</sup>

**Table 3.** Comparison of peroxidase specific activities of various intact tissues and callus of scented-geranium

Scented-geranium	Specific activity <sup>a</sup> (units/mg protein)
Mature leaf	0
Mature stem	0.23±0.07
Regenerated leaf	0.06±0.01
Regenerated stem	0.3±0.04
Callus	0.8±0.1

<sup>a</sup>Data are means ± S.E. of triple replications.

한국산 무의 유묘에서도 POD isozyme의 발현은 배양기간 뿐만 아니라 조직특이적으로 발현양상의 차이를 보였으며 이러한 변화가 무 POD mRNA의 adenylation 상태에 따라 변화된다고 보고되었다.<sup>28)</sup> 따라서 담배와 무 뿐만 아니라 제라늄의 POD isozyme의 발현패턴은 호르몬 농도변화에 의한 발달단계와 조직의 특성에 따라 특이적으로 변화됨을 알 수 있다.

### 제라늄 식물체와 캘러스의 POD활성 비교

재생 제라늄과 캘러스의 POD활성을 성숙한 제라늄식물체의 POD활성과 서로 비교하였다 (Table 3). 성숙한 제라늄식물체의 잎에는 POD 활성이 거의 존재하지 않았으나 줄기의 POD 비활성은 0.23이었다. 재생 후 2주간 키운 제라늄 잎의 POD 비활성은 0.06이었고, 재생 줄기의 POD 비활성은 0.3이었다. 이에 비해 배양 3주된 NAA와 BAP처리 캘러스의 POD 비활성은 0.8로서 식물체에 비하여 현저하게 높은 효소 활성을 나타냈다. 성숙한 제라늄 잎에 POD 활성이 거의 나타나지 않은 결과를 통하여 방향성 제라늄잎에는 POD보다는 주로 방향성 물질의 대사와 분비에 필요한 효소가 주로 분포할 것으로 추측할 수 있다. 고구마 배양세포의 경우 POD cDNA(*swpa1*, *swpa2*, *swpa3*와 *swpn1*)들이 캘러스에서 강하게 발현되었으나, 고구마 식물체의 잎에서는 발현되지 않았다. 그러나 상처, 저온, 오존 등을 처리하면 식물체에서 대부분 강하게 발현되었다고 보고되었다.<sup>15,16)</sup> 따라서 식물체와 캘러스간의 POD 활성비교는 특정 POD isozyme의 생리적 기능을 규명하는데 이용될 수 있을 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 연구비 지원(1997-011-D-00020)으로 수행되었다.

### 참고문헌

1. Grisebach, H. and Conn, E. E. (1981) In 'Lignins: Biochemistry of Plants,' Conn. E., Ed., Vol. 7, pp. 475-478, Academic Press, New York.
2. Bakardjieva, N. T., Christova, N. V. and Neukova, R. (1997) Effect of calcium and copper ions and some amino acid on the activity and thermosensitivity of mosses peroxidase and catalase. In 'Plant Peroxidase Newsletter,' Penel, C., Gaspar, T. and Greppin, H., Eds., pp. 43-50, University of Geneva,

- Switzerland.
3. Nagano, S., Tanaka, M., Ishimori, K., Watanabe, Y. and Morishima, I. (1996) The catalytic roles of distal site asparagine-histidine couple in peroxidases. In 'Plant Peroxidase, Biochemistry and Physiology,' Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H., Eds., pp. 27-33, University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.
  4. Van Huystee, R. B. and Cairns, W. L. (1982) Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Phytochemistry* **21**, 1843-1847.
  5. Antje, B., Ahmed, A., Marina, A., Andreas, B. and Karl-Josef, D. (1996) Heavy metal induced changes in peroxidase activity in leaves, roots and cell suspension cultures. In 'Plant Peroxidase, Biochemistry and Physiology,' Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H., Eds., pp. 374-379, University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.
  6. Bakardjieve, N. T., Christova, N. V. and Christov, K. (1996) Reaction of peroxidase from different plant species to increased temperatures and the effect of calcium and zinc. In 'Plant Peroxidase, Biochemistry and Physiology,' Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H., Eds., pp. 345-351, University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.
  7. Bakardjieve, N., Christova, N., Nenkova, R. and Christov, K. (1999) Calcium ions, proline, tryptophan, valine and alanine are effectors of the activity and thermostability of horseradish peroxidase. In 'Plant Peroxidase Newsletter,' Penel, C., Gaspar, T. and Greppin, H., Eds., pp. 47-52, University of Geneva, Switzerland.
  8. Lee, M. Y., Chio, Y. and Kim, S. S. (1994) Purification and immunological relationships of six radish isoperoxidases. *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 259-265.
  9. Lee, M. Y. and Kim, S. S. (1994) Characteristics of six isoperoxidases from Korean radish root. *Phytochemistry* **35**, 287-290.
  10. Lee, M. Y. and Kim, S. S. (1998) Characteristics of a low molecular weight minor isoperoxidases A3n from radish. *Kor. Biochem. J.* **31**, 548-553.
  11. Lee, M. Y. and Kim, S. S. (1998) Inactivation and cleavage of radish peroxidase by various reducing agents. *Phytochemistry* **49**, 23-27.
  12. Lee, M. Y. and Kim, S. S. (1993) Essential sulfhydryl residue in radish peroxidase isozyme. *Kor. Biochem. J.* **26**, 151-156.
  13. Toshihide, O., Yoko, M., Hikaru, S., Toshikazu, M. and Tomoyoshi, I. (1997) Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. *Plant Science* **125**, 137-145.
  14. Lagrimini L. M., Burkhart W., Moyer M. and Rothstein S. (1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin forming peroxidase from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 7542-7546.
  15. Kim, K. Y., Huh, G. H., Lee, H. S., Kwon, Y. Y., Hur, Y. and Kwak, S. S. (1999) Molecular characterization of cDNAs for two anionic peroxidases from suspension cultures of sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 941-947.
  16. Yun, B. W., Lee, H. S., Kwon, S. Y., Kim, J. S. and Kwak, S. S. (1999) Response of transgenic tobacco plants expressing sweet potato peroxidases to gamma radiation. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* **26**, 265-269.
  17. Pellegrineschi, A., Damon, J., Valtorta, N., Paillard, N. and Tefer, D. (1994) Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Bio/Technology* **12**, 64-68.
  18. Boase, M. R., Deroles, S. C., Winfield, C. S., Butcher, S. M., Borst, N. K. and Butler, R. C. (1996) Genetic transformation of regal pelargonium (*Pelargonium × domesticum* 'Dubonnet') by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* **121**, 47-61.
  19. Yarrow, S. A., Cocking, E. C. and Power, J. B. (1987) Plant regeneration from cultured cell-derived protoplasts of *Pelargonium aridum*, *P. × hortorum* and *P. peltatum*. *Plant Cell Rep.* **6**, 102-104.
  20. Raj, S. K., Bi, Y. M. and Saxena, P. K. (1997) Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation system for scented geranium (*Pelargonium* sp. 'Frensham'). *Planta* **201**, 434-440.
  21. Lowry O. H., Rosebrought N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **93**, 265-275.
  22. Dunbar, K. B. and Stephens, C. T. (1989) Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium × hortum*) and regal geranium (*Pelargonium × domesticum*) from primary callus cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **19**, 13-21.
  23. Marsolias, A. A., Wilson, D. P. M., Tsuita, M. J. and Senaratna, T. (1991) Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium × hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium × domesticum*). *Can. J. Bot.* **69**, 1188-1193.
  24. Christena, V., Javed, A. Q., Ravinder, G. and Praveen, K. S. (1992) Morphoregulatory role of thidiazuron. *Plant Physiol.* **99**, 1704-1707.
  25. Lakshmana Rao, P. V. (1994) In vitro plant regeneration of scented-leaved geranium *Pelargonium graveolens*. *Plant Science* **98**, 193-198.
  26. Robichon, M. P., Renou, J. P. and Jalouzot, R. (1995) Genetic transformation of *Pelargonium × hortorum*. *Plant Cell Rep.* **15**, 63-67.
  27. Kim, E. S. and Kim, S. S. (1985) Isoperoxidases and translatable isoperoxidase mRNAs in shoots and non-shoot-forming tobacco callus. *Kor. Biochem. J.* **18**, 259-265.
  28. Lee, M. Y. and Kim, S. S. (1990) Tissue specific expression of peroxidase isozymes during the growth of Korean radish seedlings. *Kor. Biochem. J.* **23**, 503-509.

---

**Plant Regeneration of Geranium (*Pelargonium graveolense*) Callus and Changes of Peroxidase Isozyme Pattern**

Seok-Hyun Lee and Mi-Young Lee(Department of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan, Choongnam 336-745, Korea)

**Abstract :** Callus was induced from the petioles of scented-geranium (*Pelargonium graveolense*) in MS medium containing various concentrations of plant growth regulators. The highest frequency of more than 70% of callus was induced in 2 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP or 2 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP combined treatment, while not in 2,4-D, NAA or BAP alone. When the callus was transferred to the MS medium containing 0.05 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP, the highest intensity of shoot formation, 14 shoots/callus, was induced after 5 weeks. The highest rooting was observed on hormone-free rooting media from the regenerated shoots after 3 weeks, indicating that the regeneration from geranium callus might be possible by changing the hormone ratios. Peroxidase (POD) specific activities in callus induced from 2 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP were higher than those of 2 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP callus during the entire culture periods. POD isozyme C3 was the main cathodic POD isozyme expressed in NAA and BAP callus, while C1 was the main in 2,4-D and BAP callus. However, anodic POD isozymes, A1, A2 and A3 were expressed with similar activities in both hormone combinations.

---

Key words : Scented-geranium, callus, regeneration, peroxidase

\*Corresponding author