

## Superoxide dismutase의 활성차이에 따른 식물세포의 paraquat에 대한 반응과 핵 DNA 손상 검정

권순태\* · 이명현 · 오세명 · 정도철<sup>1</sup> · 김길웅<sup>2</sup>

안동대학교 생명자원과학부, <sup>1</sup>상주대학교 자원식물학과, <sup>2</sup>경북대학교 농학과

Received June 14, 2004 / Accepted August 4, 2004

**Nucleus-DNA Damage and Different Response of Plant Cells to Paraquat in Relation to Enzyme Activity of Superoxide Dismutase.** Soon-Tae Kwon\*, Myung-Hyun Lee, Sei-Myoung Oh, Do-Chul Jung<sup>1</sup> and Kil-Ung Kim<sup>2</sup>. School of Bioresources Science, Andong National University, Kyungpook 760-749, Korea. <sup>1</sup>Department of Plant Resources, Sangju National University, Kyungpook 642-130, Korea, <sup>2</sup>Department of Agronomy, Kyungpook National University, Kyungpook 702-701, Korea – This study was undertaken to investigate the different responses of cultured plant cells to paraquat treatment and nucleus-DNA damage in relation to enzyme activity of superoxide dismutase (SOD). Furthermore, this study was also carried out to understand the antioxidative mechanism of plant cells to environmental stress. We selected two different species of plant cultured cells, *Ipomoea batatas* as high-SOD species and *Lonicera japonica* as low-SOD species. The total activity and specific activity of SOD in a chlorophyllous cell of *I. batatas* were 3,736 unit/g · fresh weight and 547 unit/mg · protein, respectively, and those in *L. japonica* were 23 unit/g · fresh weight and 13 unit/mg · protein, respectively. SOD activity in chlorophyllous *I. batatas* cells reached its maximum level at 10 to 15 days after subculture, whereas that in *L. japonica* remained at a very low SOD level during the whole period of subculture. In comparison to *L. japonica*, *I. batatas*, a high-SOD species, showed high tolerance to paraquat 10 and 50 mg/l treatment in terms of cell viability and electrolyte leakage. Based on the result of comet assay, the nucleus-DNA damage of two species by paraquat 50 mg/l treatment was not significantly different. However, *I. batatas* cells repaired their damaged DNA more effectively than the cells of the low-SOD species, *L. japonica*.

**Key words** – Comet assay, DNA damage, oxidative stress, SOD activity, cultured chlorophyllous cells

식물세포는 생물적·비생물적 환경스트레스에 직면하게 되면 O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH 등과 같은 반응성이 높은 독성의 활성산소를 생산하는 것으로 알려져 있다[1,6,9]. 이들 활성산소는 식물이 자체 생산하는 ascorbic acid, tocopherol, carotene, glutathione 등과 같은 저분자의 항산화물질이나 superoxide dismutase, peroxidase, catalase 등과 같은 항산화효소에 의해 제거된다[1,12]. 식물에 활성산소를 발생시키는 주요 스트레스로는 병충해의 감염, 오존, 오염물질, 제초제, 산성비, 자외선, 감마선 등과 같이 다양한 요인이 있다. 식물이 높은 항산화능을 보유하게 되면 이들 스트레스로부터 발생된 활성산소는 효율적으로 제거되어 궁극적으로 스트레스에 대한 저항성을 가지게 된다[1,2,8]. 항산화효소 중 superoxide dismutase (SOD)는 생체에서 생성되는 활성산소 중 가장 독성이 강한 O<sub>2</sub>를 제거하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성하고, OH의 생성을 억제함으로써 세포를 활성산소의 해로부터 보호하게 된다[10].

접촉형 비선택성 제초제인 paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion)는 엽록체 내에서 광합성의 명반응으로 발

생되는 전자에 의해 paraquat 이온으로 전환된다[5,7]. 이들은 다시 빛, 물, 산소가 있는 상태에서 이온형태로 자동산화하게 되는데, 이 과정에서 활성산소를 발생시켜 식물체를 고사시키는 것으로 알려져 있다[5,7]. 최근에는 POD, SOD 등과 같은 항산화효소와 관련된 유전자를 형질전환하여 paraquat에 대한 저항성식물체를 개발하려는 시도가 이루어지고 있다[9,16].

본 연구는 항산화효소인 SOD의 생체 내 활성이 크게 차이가 나는 고구마와 인동의 배양세포를 대상으로 paraquat 처리에 대한 식물의 반응과 SOD 활력변화, 핵 DNA의 손상과 회복정도를 구명함으로써 식물의 산화적 스트레스에 대한 내성과 항산화 기작을 이해하고자 수행되었다.

### 재료 및 방법

#### 식물세포 및 배양

예비실험에서 식물배양세포 20여종의 SOD의 활성을 측정한 결과 활성이 가장 높게 나타났던 고구마(*Ipomoea batatas*)와 가장 낮게 나타났던 인동(*Lonicera japonica*)을 본 실험의 재료로 사용하였다. 고구마와 인동세포는 각각 성장점과 접합배에서 유도된 것으로 엽록소가 전혀 함유되지 않은 흰색

#### \*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5623, Fax : +82-54-820-5785

E-mail : skwon@andong.ac.kr

의 캘러스와 엽록소가 세포 1 g 당 20 µg 이상 함유된 녹화된 캘러스를 사용하였다. 흰색 캘러스는 MS 기본배지[11]에 2,4-D 1.0 mg/l, sucrose 30 g/l가 함유된 액체배지에서 25°C 암상태로 배양하였으며, 녹화캘러스는 LS배지에 NAA 0.1 + zeatin 0.5 mg/l, sucrose 20 g/l가 함유된 액체배지에서 25°C 광상태로 배양하였다.

### SOD 활성 측정

조효소액의 조제를 위해 계대배양 후 10일째에 배지를 제거한 세포를 액체질소를 가하여 완전히 마쇄하였다. 마쇄된 세포에 0.05 M 인산완충액(pH 7.8)을 첨가하여 30분간 추출 후, 4°C 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 취하였다. SOD의 활성은 xanthine oxidase와 cytochrome c를 이용한 McCord와 Fridovich[10]의 방법에 준하여 측정하였다. 효소활성 측정을 위한 반응액은  $10^{-3}$  M xanthine 2.5 ml,  $10^{-3}$  M cytochrome c 0.5 ml,  $10^{-4}$  M EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액(pH 7.8) 47 ml을 혼합하여 사용하였다. 효소반응은 반응액 1 ml과 효소액 10 µl를 큐벳에 넣은 후,  $10^{-4}$  M EDTA를 포함한 인산완충액(pH 7.8)으로 xanthine oxidase 10 µl를 첨가하여, 25°C에서 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 조사하였다. 흡광도는 정제된 SOD효소(Sigma社)를 희석배수별로 표준곡선을 작성하여 시료의 SOD 활성을 계산하였다. 단백질 함량은 Bradford[3]의 방법에 따라 측정하였다.

### 세포활력 및 전해물질 누출측정

세포활력은 Towill과 Mazur[15]의 방법으로 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)로 측정하였다. 2.4% TTC가 포함된 50 mM 인산완충액(pH 7.5)에 일정량의 세포를 넣고, 25°C 암상태에서 24시간 방치한 후 상등액을 제거하고 95% EtOH로 염색된 색소를 추출하여 485 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전해물질의 누출량 측정은 paraquat을 처리한 세포를 채취하여 증류수를 넣고, 2시간 동안 진탕한 후 전기전도도를 측정하였다. Paraquat은 원액을 일정농도로 희석한 후 여과멸균을 하였으며, 배지를 포함한 농도가 10, 50, 100 mg/l가 되도록 배지에 직접 주입하였고 25°C의 광상태를 유지하였다.

### Comet 분석

세포의 핵 DNA 손상정도를 알아보기 위한 comet 분석은 Rojas 등[14]의 방법에 따라, 냉각된 슬라이드에 1.0% agarose를 도포한 후 세포액 10 µl와 1.0% 저융점 agarose 90 µl를 혼합하여 슬라이드에 도포하고 커버글라스를 덮어 4°C에서 10분간 방치하였다. 제조된 슬라이드를 해리용액에 1시간 동안 침지시킨 후, 300 mA에서 25분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 각각의 슬라이드를 0.4 M Tris (pH 7.5) 용액으로 5분간 2회 세척하고, EtBr로 염색한 후 형광현미경(200x, DM IL, Leica)으로 관찰하였다. Comet 이미지는 'Komet 5.0' software (Kinetic Imaging, UK)를 사용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### SOD의 활성과 생장 비교

본 연구는 고구마 및 인동 배양세포로부터 엽록소가 함유된 녹화세포(chlorophyllous cell)를 유도하여 실험하였다. 고구마와 인동 배양세포의 SOD 활성을 보면, Table 1과 같다. 고구마는 단위세포당 활성도(unit/g · fresh weight)가 흰색세포는 3,037 unit, 녹화세포는 3,736 unit였고, 비활성도(unit/mg · protein)는 흰색세포 407 unit, 녹화세포 547 unit였다. 인동은 단위세포당 활성도는 흰색세포 19 unit, 녹화세포 23 unit였고, 비활성도는 흰색세포 12 unit, 녹화세포 13 unit였다. 고구마와 인동 SOD의 단위세포당 활성도는 흰색세포와 녹색세포 간에 유의한 차이는 없었다. 비활성도는 인동은 흰색세포가 12 unit, 녹화세포가 13 unit로 비슷하였으나, 고구마는 녹화세포(547 unit)가 흰색세포(407unit) 보다 높았다. 전체적으로 보아 고구마세포가 인동세포에 비해 SOD의 활성이 월등히 높은 것으로 나타났다(Table 1). Kwak 등[8]은 여러 종류의 배양세포로부터 추출한 SOD의 활성 비교한 결과 고구마는 단위세포당 활성도가 673 unit, 비활성도가 1,300 unit이라고 보고 하였는데, 본 실험에서는 고구마, 인동 공히 단위세포당 활성도가 비활성도보다 높은 것으로 조사되었고, SOD의 활성이 높았던 녹화세포를 이용하여 지속적인 실험을 수행하였다.

고구마와 인동의 녹화배양세포의 배양시기별 생체중과 세

Table 1. Enzyme activity of superoxide dismutase from suspension cells of *Ipomoea batatas* and *Lonicera japonica*<sup>1)</sup>

Culture cells	Total activity (unit/g fresh wt.)		Specific activity (unit/mg protein)	
	White callus	Green callus <sup>2)</sup>	White callus	Green callus
<i>Ipomoea batatas</i>	3,037 ± 370.4	3,736 ± 660.7	407 ± 49.6	547 ± 71.7
<i>Lonicera japonica</i>	19 ± 4.2	23 ± 4.6	12 ± 2.8	13 ± 3.4

<sup>1)</sup>Enzyme activity of SOD was determined at 10 days after subculture.

<sup>2)</sup>White calli were suspension cultured in MS medium with 2,4-D 1.0 mg/l, sucrose 30 g/l and green calli were in LS with NAA 0.1 + zeatin 0.5 mg/l, sucrose 20 g/l.

포화력의 변화를 조사하였다(Fig. 1). 세포의 생체중을 비교해 보면, 이들 세포는 모두 계대배양 후 5일에서 10일 사이가 최대생장으로 나타났으며, 그 이후는 생장의 증가가 거의 일어나지 않거나 감소하는 정체기로 추정되었다. 배양세포의 활력은 배양 1일째에는 두 세포 모두 최저 수준을 보이나 계속적으로 증가하여 생체중이 최대에 도달하는 10일째에 최고의 세포활력을 보였다. 정체기인 15일째에는 두 세포 모두 세포활력이 급격히 감소하나 고구마가 인동세포보다 활력의 감소가 적었다. 계대배양 후 배양기간별로 조사한 SOD의 단위세포당 활성도는 보면 고구마 배양세포의 경우 세포의 생체중 증가폭선과 거의 비슷하게 증가하여 10일 및 15일째에 최대에 도달하였다(Fig. 2). 그러나 인동세포는 배양기간 중

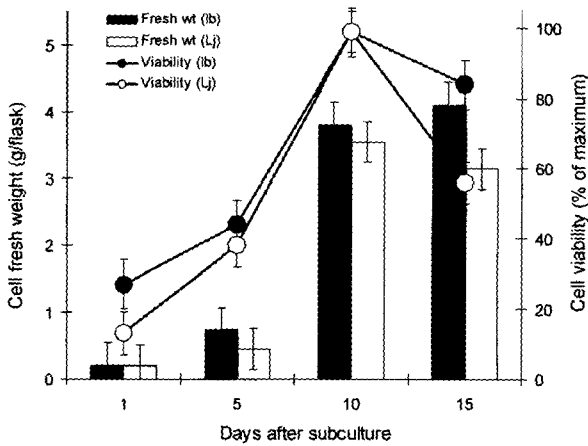


Fig. 1. Changes in cell viability and fresh weight of *Ipomoea batatas* (Ib) and *Lonicera japonica* (Lj) chlorophyllous cells during subculture. 100 mg of cells were initially inoculated in 250 ml flask containing 80 ml of LS medium with NAA 0.1+zeatin 0.5 mg/l, sucrose 20 g/l.

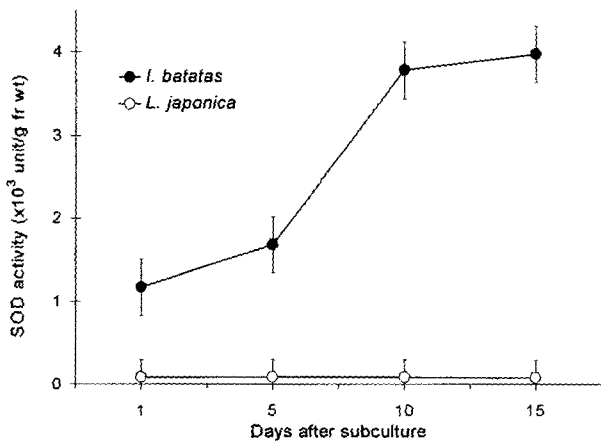


Fig. 2. Changes of enzyme activity in *Ipomoea batatas* and *Lonicera japonica* chlorophyllous cells during subculture. 100 mg of cells were initially inoculated in 250 ml flask containing 80 ml of LS medium with NAA 0.1 + zeatin 0.5 mg/l, sucrose 20 g/l.

SOD 활성의 변화가 거의 나타나지 않았고 아주 낮은 상태를 유지하였다. 또한, 본 연구에서는 이들 녹화식물세포를 대상으로 세포에 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려진 paraquat에 대한 반응을 조사하였다.

**Paraquat에 대한 반응**

Paraquat을 농도 0, 10, 50 및 100 mg/l이 되도록 배양세포에 처리하여 세포활력과 전해물질의 누출정도를 조사하였다(Fig. 3). 고구마와 인동 배양세포의 전해물질 누출정도는 처리한 paraquat의 농도가 높아질수록 증가하였다. 고구마는 paraquat 10 및 50 mg/l 처리에서 누출정도가 무처리에 비해 3.5배 및 6배가 증가한 반면, 인동세포는 각각 8.5배 및 11배가 증가하여 고구마에 비해 인동이 전해물질의 누출정도가 심한 것으로 나타났다. 그러나 고농도인 paraquat 100 mg/l을 처리한 세포의 전해물질의 누출정도는 고구마가 무처리에 비해 22배, 인동이 14배로 고구마가 인동에 비해 오히려 높았다. 배양세포의 활력은 paraquat 농도가 높아질수록 현저한 억제를 보였다. 저농도인 10 및 50 mg/l 처리에서는 고구마가 인동보다 세포활력이 높으나 고농도인 100 mg/l에서는 고구마가 오히려 인동보다 낮게 나타났다. Paraquat은 비선택성 제초제로 과수원 등에서 500 mg/l 내외의 농도로 사용되고 있다. 따라서 본 실험에 사용된 paraquat 100 mg/l은 배양세포 수준에서는 세포를 완전히 고사시키는 농도인 것으로 간주되며, 이 농도에서는 세포의 항산화능이나 저항성과 관계없이 모든 세포가 고사되는 것으로 추정된다. 고농도인 paraquat 100 mg/l 처리에서는 고구마가 인동에 비해 전해물질의 누출정도가 심하였다.

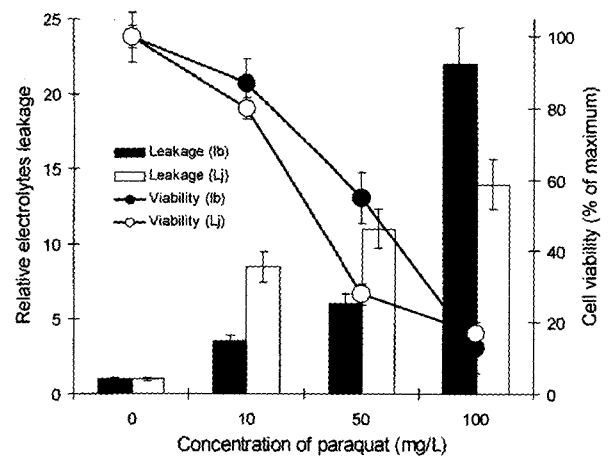


Fig. 3. Effects of various concentrations of paraquat on electrolyte leakage and cell viability of *Ipomoea batatas* and *Lonicera japonica* chlorophyllous cells. Paraquat was treated directly into media for 6 hrs at 10 days after subculture. 100 mg of cells were initially inoculated in 250 ml flask containing 80 ml of LS medium with NAA 0.1+zeatin 0.5 mg/l, sucrose 20 g/l.

Paraquat처리 농도별 두 식물세포의 SOD의 효소활성을 조사한 결과(Fig. 4), 고구마 배양세포는 10 mg/l처리까지는 효소활성이 거의 변화가 없었으나 50 mg/l 처리에서는 단위 세포당 활성도가 1,021 unit로 무처리(3,976 unit) 대비 75%가 억제되었으며, 100 mg/l 처리에서는 498 unit로 무처리보다 87%가 억제되었다. 인동세포는 paraquat의 처리농도에 관계없이 SOD 활성이 아주 낮은 상태로 유지되었다.

Paraquat은 녹색을 띠는 모든 식물체를 고사시키는 비선택성 제초제로 사용되고 있다. 주요 작용기작은 엽록체 내 광합성의 명반응에서 전자전달로 생긴 환원력을 지닌 여기 전자에 의해 paraquat 유리기로 변환된다. 그것은 다시 빛, 물, 산소가 있는 상태 하에서 이온형태로 자동산화하게 되며, 이 과정에서 활성산소가 발생하여 식물체를 고사시키는 것으로 알려져 있다[5,7]. Furusawa 등[5]은 담배 배양세포에 수차례의 계대배양을 통하여 paraquat에 저항성인 세포를 선발하였는데, 이들 세포는 타 세포에 비해 SOD 활성이 14-159배가 높다고 하였다. 또한, 최근에는 CuZn-SOD 유전자를 형질전환한 담배식물체에 paraquat를 처리하면 담배의 내성이 증가한다는 것을 확인한 바 있다[9]. 본 실험에서는 SOD의 활성이 높은 종인 고구마가 낮은 종인 인동에 비해 10-50 mg/l paraquat 처리에 대한 내성이 높은 것으로 확인되었다.

### 핵 DNA 손상정도

Comet 분석은 세포로부터 핵 DNA를 온전한 상태로 해리하여 전기영동을 실시하여 DNA 손상정도를 측정하는 방법으로 단세포전기영동법(single cell gel electrophoresis) 이라

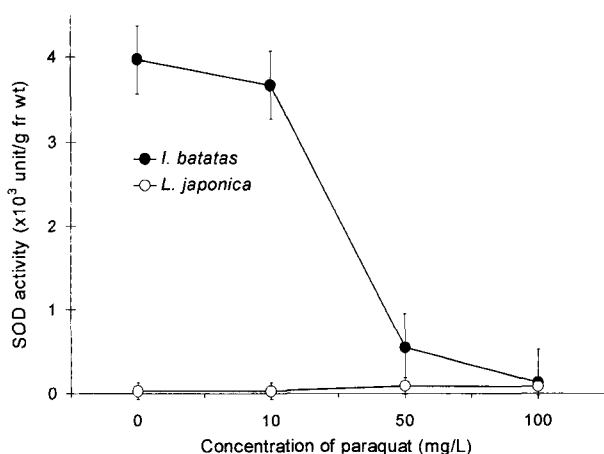


Fig. 4. Effects of various concentrations of paraquat on enzyme activity of superoxide dismutase in *Ipomoea batatas* and *Lonicera japonica* chlorophyllous cells. Paraquat was treated directly into media for 6 hrs at 10 days after subculture. 100 mg of cells were initially inoculated in 250 ml flask containing 80 ml of LS medium with NAA 0.1+zeatin 0.5 mg/l, sucrose 20 g/l.

고 한다[4,14]. DNA가 손상되지 않은 핵의 모양은 전기영동 후에도 원형을 유지하나 핵 DNA가 손상된 경우는 잘려진 DNA 단편들이 전기영동에 의해 이동되므로 핵의 모양이 긴 꼬리를 가진 혜성의 모양을 가진다고 comet 분석이라 한다(Fig. 5). DNA의 손상정도는 혜성처럼 관찰되는 핵의 머리부분(head, H)의 길이와 꼬리부분(tail, T)의 길이를 측정하여 T/H 비율로 나타낸다(Fig. 5). 본 실험에서는 50 mg/l의 paraquat을 배양세포에 처리한 후 T/H 비율을 구하고 머리 부분에 남아있는 DNA함량(% head DNA)을 조사하였다. Paraquat을 6시간 처리한 직후의 T/H 비율을 보면, 고구마와 인동이 각각 5.3과. 6.4로 무처리 세포가 각각 1.5 및 1.6인 것에 비해 꼬리의 비율이 현저히 증가하였다(Table 2). 한편, 핵의 머리부분에 남아있는 head-DNA의 량은 무처리 세포의 고구마 및 인동이 84.5% 및 80.5%인 반면, paraquat을 처리한 것은 각각 53.5% 및 50.1%로 현저히 줄어들었다. 이 결과는 고구마와 인동이 paraquat 처리에 의해 핵 DNA에 심한 손상을 받았다는 것을 의미한다. Paraquat 50 mg/l를 6시간 동안 처리한 직후에는 핵의 DNA 손상정도가 고구마와 인동세포 간에 큰 차이가 없었으나, paraquat 처리 후 세포를 paraquat이 없는 배지에 옮겨 5일간 배양한 경우에는 고구마와 인동세포 간에 뚜렷한 차이를 보였다. 5일 후의 T/H

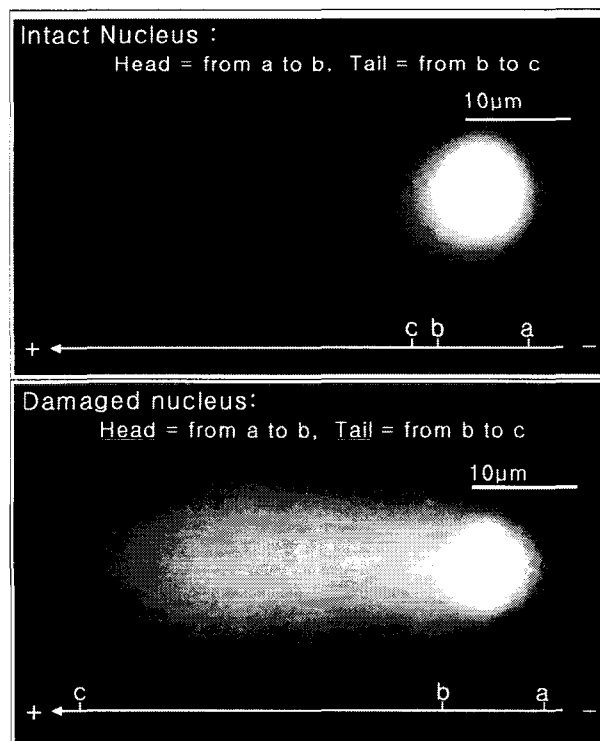


Fig. 5. Typical comet image of intact (upper) and DNA-damaged (lower) nucleus. Isolated nuclei were electrophoresised at 300 mA for 25 min and DNA stained with EtBr. Head length is considered as the length from 'a' to 'b', and tail length as from 'b' to 'c'.

Table 2. The comet assay of *Ipomoea batatas* and *Lonicera japonica* cell treated with paraquat 50 mg/l<sup>1)</sup>

Days after treatment (DAT)	<i>Ipomoea batatas</i>		<i>Lonicera japonica</i>	
	T/H ratio <sup>2)</sup>	% head DNA	T/H ratio	% head DNA
Control	1.6±0.4	82.5±3.8	1.8±0.2	81.4±3.3
Just after treatment	5.7±0.6	54.7±4.8	6.7±0.8	52.2±2.9
5 DAT	2.7±0.4	72.2±4.7	4.6±0.8	64.8±6.3

<sup>1)</sup>Cultured cells were treated with paraquat 50 mg/l for 6 hours and rinsed with medium solution to remove the paraquat, and then cells were cultured in paraquat free media. Values are mean±SE.

<sup>2)</sup>T/H ratio: ratio of tail length to head length after the comet analysis.

비율은 고구마가 2.8로 처리 직후(5.3)에 비해 다시 꼬리의 길이가 짧아졌고, head-DNA 량도 70.2%로 상당 부분이 회복된 것을 알 수 있었다. 그러나 인동은 5일 후에 T/H 비율이 4.3, head-DNA 함량이 63.5%로 고구마보다 DNA의 회복정도가 낮게 나타났다.

Comet 분석은 주로 핵 DNA의 손상과 회복정도를 측정하는 중요한 방법으로 유전독성학, 의학, 오염피해 측정, 식품의 방사선 조사여부 측정 등 다양한 분야에 이용되고 있다 [4,14]. Comet 분석결과 paraquat의 처리에 의한 나타난 고구마와 인동세포간 DNA 회복정도의 차이는 이들 식물의 항산화능과 관계가 있을 것으로 추정된다. 산화적 스트레스는 생물체의 핵 DNA에 심각한 손상을 초래하는데 식물체는 항산화능을 높임으로써 생물이 산화적 스트레스로부터 받는 핵 DNA의 손상으로부터 보호하거나 손상된 DNA의 수선 및 회복을 촉진한다고 한다[13,14].

이상의 실험 결과를 종합해 보면 SOD의 효소활성이 높은 고구마세포와 활성이 낮은 인동세포가 모두 paraquat에 의해 심각한 피해를 받는 것으로 나타났다. 그러나 SOD 활성이 높은 고구마세포는 paraquat 처리에 대한 세포활력의 감소정도나 전해물질의 누출정도가 인동세포에 비해 낮으며, 손상된 핵 DNA를 회복하는데도 효과적이었다. 종합적으로 SOD 활성이 높았던 고구마세포가 인동세포에 비해 paraquat에 대한 내성이 높은 것으로 나타났다. 이 결과는 이 후 식물의 항산화능과 관련하여 환경내성 기작을 연구하고 산화적 스트레스에 대한 저항성 자원을 탐색하는데 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

Superoxide dimutase (SOD) 효소활성이 높은 세포주인 고구마(*Ipomoea batatas*)와 낮은 세포주인 인동(*Lonicera japonica*)을 대상으로 paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion)처리에 대한 세포활력 변화, SOD 활성변화 및 핵 DNA의 손상과 회복정도를 조사하였다. 고구마의 녹화 현탁배양 세포는 단위세포당 SOD 활성도(unit/g fresh weight)와 비활성도 (unit/mg protein)가 각각 4,036 및 547 unit인 반면, 인동세포는 각각 23 및 13 unit로 고구마에 비하여 현저히 낮

았다. 고구마 배양세포는 계대배양 후 10일에서 15일 사이에 최대의 SOD 활성을 보이나 인동의 배양세포는 배양기간 동안 SOD 활성의 증가가 나타나지 않고 활성이 낮은 상태로 유지되었다. Paraquat 10 및 50 mg/l 처리에서 고구마세포가 인동세포에 비하여 세포활력이 높고 전해물질의 누출정도가 낮은 것으로 나타났다. Paraquat 50 mg/l를 처리한 고구마와 인동의 배양세포로 comet 분석을 실시한 결과, 처리 초기의 핵 DNA 손상정도는 두 종의 세포 간에 차이가 없었으나 손상된 DNA의 회복정도는 고구마가 인동에 비해 큰 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 논문은 2004학년도 안동대학교 특별연구비 지원사업에 의해서 수행된 결과의 일부임.

## 참 고 문 헌

- Alscher, R. G. and J. L. Hess. 1993. *Antioxidants in Higher Plants*. pp. 1-174. CRC Press, Raton.
- Bowler, C., W. Van-Comp, M. Van-Montagu and D. Inze. 1994. Superoxide dismutase in plants. *CRC Critical Reviews in Plant Science* **10**, 199-218.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 265-270.
- Fairbairn, D. W., P. L. Olivie and K. O' Neill. 1995. The comet assay : a comprehensive review. *Mutation Research* **339**, 37-44.
- Furusawa, I., K. Tanaka, P. Thanutong, A. Mizuguchi, M. Yazaki and K. Asada. 1984. Paraquat resistant tobacco calluses with enhanced superoxide dismutase activity. *Plant Cell Physiology* **25**, 1247-1254.
- Hewitt, N., G. Kok and R. Fall. 1990. Hydrogen peroxide in plants exposed to ozone mediates air pollution damage to alkene emitters. *Nature* **344**, 56-58.
- Kim, K. U., D. U. Kim and S. T. Kwon. 1986. Development of herbicide (paraquat) tolerant plant through tissue culture. *Korean J. Weed Science* **6**, 191-200.
- Kwak, S. S., S. K. Kim, S. H. Kim and J. R. Liu. 1995.

- Selection and isoenzyme analysis of plant cell line for high yield of superoxide dismutase, *Korean J. Plant Research* **23**, 103-106.
9. Kwon, S. Y., Y. J. Jeong, H. S. Lee, J. S. Kim, K. Y. Cho, R. D. Allen and S. S. Kwak. 2002. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologene-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environment* **25**, 873-882.
  10. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chemistry* **244**, 6049-6055.
  11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
  12. Noroozi, M., W. J. Angerson and M. E. J. Lean. 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American J. Clinical Nutrition* **64**, 1210-1218.
  13. Price, A. and A. Hendry. 1991. Iron-catalyzed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environment* **14**, 477-484.
  14. Rojas, E., M. C. Lopez and M. Valverde. 1999. Single cell gel electrophoresis assay; methodology and application. *J. Chromatography B* **772**, 225-254.
  15. Towill, L. E. and P. Mazur. 1975. Studies on reduction of 2,3,5-triphenylterazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture. *Canadian J. Botany* **53**, 1097-1102.
  16. Yun, B. W., G. H. Huh, H. S. Lee, S. Y. Kwon, J. K. Jo, J. S. Kim, K. Y. Cho and S. S. Kwak. 2000. Differential resistance to methyl-viologen in transgenic tobacco plants express sweetpotato peroxidase. *J. Plant Physiology* **156**, 504-509.