

고등 식물의 형질전환에 따른 유전자 발현
II. 형질전환된 감자 괴경의 β -Glucan Synthetase II의 활성에 미치는
 Ca^{2+} 의 효과 및 Peroxidase의 변화 양상

鄭賢淑·金玲希·裴炳植*·金成俊·康榮熹**
(朝鮮大學校 遺傳工學科, *東新大學 食品營養學科, **延世大學校 生物學科)

Gene Expression in Transformed Higher Plants
II. Effect of Ca^{2+} on β -Glucan Synthetase II Activity and Changes of
Peroxidase Pattern in Transformed Potato Tuber

Cheong, Hyeon Sook, Young Hee Kim, Byoung Sik Pyo*,
Sung Jun Kim and Young Hee Kang**
(Department of Genetic Engineering, Chosun University, Kwangju,
*Department of Food Science and Nutrition, Dongshin University, Naju and
**Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

The hairy root was induced from potato tuber disc by infection of *A. rhizogenes*. The detection of the agropine and mannopine by paper electrophoresis confirmed that induced hairy root was transformed by *A. rhizogenes*. The activity of peroxidase was the highest at 5 weeks and isozyme pattern of peroxidase revealed 3 cathodic bands and 2 anodic bands and new C_4 band (pI 4.6) was observed at 7 weeks after cultivation in hairy root with isoelectric focusing. To study the effect of Ca^{2+} on cell wall formation in hairy root, channel blocker of Ca^{2+} was treated. The activity of β -glucan synthetase II (GS II) related to cell wall synthesis was inhibited by about 50% in diltiazem and flunarizine treatment than that of control, but stimulated in $CaCl_2$ treatment. Therefore these results showed that Ca^{2+} might be an effective factor in the cell wall formation. The activity of GS II by NaF treatment was increased by about 30%. This result suggested that the activity of GS II is changed through phosphorylation process.

서론

Ca^{2+} 은 식물의 생장에 있어서 필수 원소 중의 하나로 식물체의 구조와 생리, 굴지성, 세포 신장, 세포분열, 원형질 유동, 노화, 탈리 등 생화학적으로 중요한 역할을 한다 (Veluthambi and Poovaiah, 1984; Lee *et al.*, 1983). 또한 Ca^{2+} 은 calcium pectic acid의 염으로서 세포벽 구조에 영향을 주며(Stoddart and Narthcote, 1987) 특히, pectin 화합물의 카르복실기와 결합하여 세포의 강직성을 나타나

게 한다(Levine and Dalgarno, 1983). 최근 Ca^{2+} 는 second messenger 또는 signal substance로서(Veluthambi and Poovaiah, 1984) stimulus-response coupling 효과를 일으켜 target enzyme을 조절하는 것으로도 알려져 있다. 그 대표적인 효소로써 protein kinase는 Ca^{2+} 에 의해 그 활성이 촉진되며, 이로 인하여 인산화될 일으켜 어느 특정한 효소의 활성에 영향을 미친다(Gregory *et al.*, 1988). 또한 Ca^{2+} 은 산성 pH에서 세포벽 형성에 관여하는 효소의 활성을 억제하기도 한다(Bates and Ray, 1981).

한편, peroxidase는 세포의 생장과 발달을 조절하는 주요한 효소로 알려져 있으며(Seeni and Gnanam, 1981),

본 연구는 1990년도 문교부 기초과학 연구조성비 지원에 의한 것임.

phenol 화합물 및 IAA의 산화, pyridoxal과 관련된 화합물의 산화, 목질화 과정 등 다양한 기능을 가지는 것으로 보고되었다(Chibbar and Van Huystee, 1984; Pedreno *et al.*, 1987; Johnson-Flanagan and Owens, 1985; Ueng and Daly, 1985). Isozyme으로써 peroxidase의 전기영동적 특성 및 이동도의 변화는 식물의 생리, 생화학적 상태를 관찰하는데 이용될 뿐만 아니라 분화, 계통 발생, 종에 따른 특성과 식물체의 육종과 원형질체의 융합 등을 관별하는 지표로 이용되고 있다(Wetter and Dyck, 1983).

따라서 본 연구는 *A. rhizogenes* A₄를 감자 괴경에 접종하여 hairy root를 유도시켜 증식시킨 다음 Ca²⁺이 식물의 성장과 분화에 중요한 역할을 하는 세포벽 합성에 관여하는 β-glucan synthetase II (GS II)의 활성에 어떠한 특성으로 작용하는지를 Ca²⁺의 channel blocker를 사용해서 간접적으로 Ca²⁺의 효과를 관찰하였으며, Ca²⁺이 GS의 활성에 어떠한 특성으로 작용하는지를 관찰함으로써 식물세포벽 재생과 형성에 필요한 인자를 찾고자 하였으며, 성장과 분화 과정에서 효소학적 다양성을 보이는 peroxidase isozyme 발현 조절 양상을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 사용 균주. Hairy root를 유도하기 위해서 감자(*Solanum tuberosum* L. cv Dejima) 괴경을 2% sodium hypochlorite 용액에 20분간 표면 살균한 후 무균수로 3회 세척하고 1 cm 두께로 절단한 감자 절편에 2×10⁸ /ml의 *Agrobacterium rhizogenes* 균을 접종하여 27°C에서 암배양하였다. 이 때 사용된 균주는 *A. rhizogenes* A₄로 감자 추출배지(2% sucrose, 1.4% agar)에서 48시간 진탕 배양하여 접종하였다.

유도된 hairy root를 절단하여 식물 호르몬이 첨가되지 않은 MS(300 mg/l cefotaxime, 3% sucrose, pH 5.8) 배지에서 균을 제거한 후, 생장이 좋은 hairy root 만을 모아 항생제가 들어 있지 않은 액체 배지에서 진탕 배양하였다.

Opine 분석. 배양된 hairy root의 형질전환 유무를 알아보고자 Petit 등(1986)의 방법을 변형하여 opine를 검출하였다. 1g의 hairy root를 1%(v/v) HCl과 95% ethanol 3 ml를 첨가하여 마쇄한 후 원심분리 한 후 상정액을 동결 건조기에서 감압 증발시킨 후 10 μl 취하여 Whatman 3MM paper에 점적하여 수평 전기영동 장치를 사용하여 1,500 V에서 50분간 전개하였다. 전개 용매는 formic acid : acetic acid : H₂O를 30 : 60 : 910의 비율로 조성하였다. 전기영동이 끝난 후 염색액 A(0.25 g AgNO₃ in 200 ml acetone)에 염색시킨 후, 염색액 B(2% NaOH in 30% methanol)에 담구어 건조 발색시켰다. 건조 발색시킨 후 NH₄OH로 여분의 AgNO₃를 씻어내어 5% Na₂S₂O₃ 용액에 고

정하여 1시간 이상 흐르는 물로 세척한 후 band를 확인하였다.

GS 추출과 활성 측정. Cerenius와 Soderhael(1984)의 방법으로 hairy root를 냉각수로 세척하고 같은 무게의 마쇄액(1 mM sucrose, 4 mM Na-EDTA, 1 mM DTT, 20 mM GTP 등이 포함된 0.1 M Tris buffer, pH 8.0)과 혼합하여 마쇄한 다음 이 마쇄액을 6,800×g에서 15분간 원심분리하고 그 상정액을 다시 40,000×g에서 45분간 원심분리해서 얻은 침전물을 Tris 완충액을 현탁하여 조효소원으로 사용하였다. 효소반응은 200 μl의 조효소원과 800 μl의 Tris 완충액(0.02 μCi의 uridine diphospho-D-[U-¹⁴C] glucose, specific activity 223 mCi/mmol)을 27°C에서 2시간 반응시켰다. 효소반응 중지를 위해 1 ml의 10% trichloroacetic acid를 첨가한 후 잘 혼합하여 이것을 Whatman GF/C glass filter로 여과한 후 반응하지 않은 기질을 세척해 내기 위해서 10% trichloroacetic acid 용액 3 ml씩 세번, 96% ethanol로 3 ml씩 세척하였다. 이 glass filter를 잘 말린 후 10 ml의 scintillation cocktail solution에 넣고 1시간 이상 방치한 후 scintillation counter로 방사능을 측정하였다. 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하였다.

Peroxidase 활성 측정과 등전점 전기영동. Peroxidase 활성도는 Grison과 Pilot(1985) 방법을 수정하여 각 조직을 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)에서 균질화시킨 후 24,000×g에서 20분간 원심분리하여 상정액을 조효소원으로 사용하였다. 효소의 활성도는 40 mM phosphate buffer(pH 6.5), 10 mM guaiacol, 100 μl 조효소원을 첨가하여 전체 부피가 3 ml되게 하여 10분간 반응시킨 후 10 mM H₂O₂를 첨가하여 470 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 효소의 활성도는 1분간 흡광도의 변화로 정하였다. 또한 등전점 전기영동은 Stegeman과 Park(1979) 및 Coppens와 Gillis(1987)의 방법을 변형하여 0.1% ampholine(pH 3.5-10)을 첨가한 6% acrylamide gel에 10% sucrose가 첨가된 조효소원 200 μl를 침적하여 100 V에서 1시간 200 V에서 3시간 동안 전개시켰으며, 양극 용매로는 0.01 M H₃PO₄, 음극 용매로는 0.2 M NaOH를 사용하였다. 등전점 전기영동이 끝난 gel을 발색시켜 peroxidase isozyme 양상을 관찰하였고 각 band의 pH 구배는 IEF standard(Bio-Rad pl 4.6-9.6)를 이용하여 측정하였다.

Peroxidase 발색. 등전점 전기영동이 끝난 gel은 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)에 1% guaiacol이 포함된 용액 8 ml에 30분간 침지한 다음 0.2% H₂O₂ 용액 2 ml를 첨가하여 나타난 band를 조사하였다. 이 때 band는 15분 이내에 확산되므로 발색되는 즉시 관찰하였다.

결과 및 고찰

Hairy root의 배양과 opine 분석. 감자(*Solanum tu-*

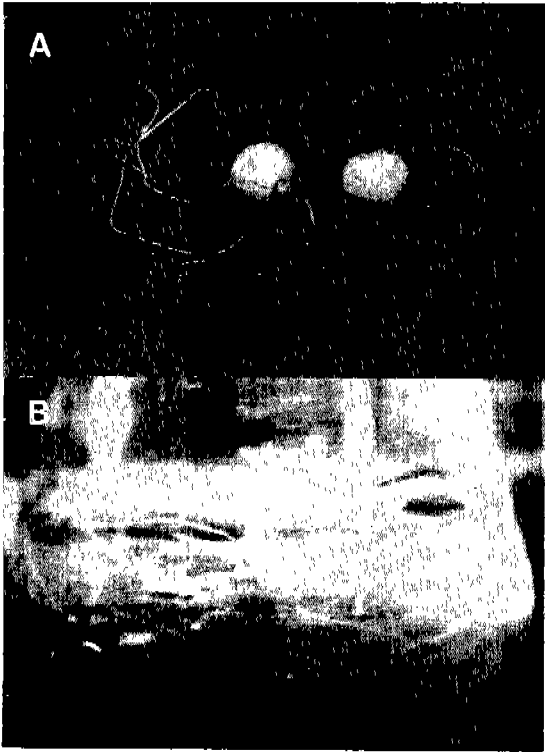


Fig. 1. Hairy root induced from potato tuber. a, Hairy root induced from potato tuber after 3 weeks inoculation with *A. rhizogenes*; b, Hairy root cultured in liquid MS medium after 4 weeks culture.

berosum) 과정에서 *A. rhizogenes*를 접종하여 배양 2-4주 후에 hairy root가 유도되었으며(Fig. 1a) 계속 증식시키기 위해 유도된 hairy root를 항생제가 들어 있지 않은 배지에서 4주간 배양한 결과는 Fig. 1b와 같았다.

*A. rhizogenes*의 Ri-plasmid의 T-DNA에는 opine이라는 특수한 아미노산이 생성되는데 이는 식물체에서는 합성되지 않는 것으로 알려진 특수한 화합물로 Agrobacteria의 탄소원과 질소원으로 이용되는 중요한 영양 공급원이다. 특히 *A. rhizogenes* A₄는 agropine type으로 형질전환된 hairy root는 T-DNA의 발현에 의해 agropine과 mannopine을 합성한다고 알려져 있다(Petit *et al.*, 1986). 따라서 hairy root의 형질전환 여부를 알아보기 위해서 opine 합성 유무를 본 것으로 일반 과정에서 opine이 검출되지 않았으나 hairy root에서는 mannopine과 agrinine이 검출되었다(Fig. 2). 이는 유도된 hairy root가 형질전환이 되었음을 알 수 있었다.

β -Glucan synthetase II 활성도. Fig. 3는 hairy root의 세포벽 형성에 관여하는 β -glucan synthetase II(GS II)의 활성에 대한 Ca^{2+} 의 효과를 나타냈다. Hairy root에 Ca^{2+} 를



Fig. 2. Opine test of hairy root induced from potato tuber by paper electrophoresis. C, control; H, hairy root; A, agropine; M, mannopine.

0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM씩 각각 처리하여 4시간 동안 현탁 배양하여 GS II 활성을 4번 측정하여 평균값을 비교한 결과 0.1 mM의 Ca^{2+} 처리구에서는 대조구보다 60% 정도, 0.01 mM과 1 mM에서는 각각 10%, 20% 정도 촉진되었다. 이는 Ca^{2+} 이 second messenger로서 세포내에서 양이온의 특성으로 인산화를 통해 효소가 갖고 있는 공유결합의 변형을 일으켜 효소 활성을 촉진시킬 수 있다는 것(Paliyath and Poovaiah, 1988)과 이러한 과정을 일으키는데 필요한 protein kinase가 관여하는 GS II 활성에 영향을 미친다는 보고(Kato, 1981)를 고려할 때 hairy root에서도 비슷한 양상으로 효소의 활성이 증가된 것으로 사료된다.

또한 hairy root 증식 배지에는 기본적으로 Ca^{2+} 이 함유되어 있으므로 간접적으로 Ca^{2+} 의 효과를 보기 위하여 세포내의 Ca^{2+} 의 작용을 억제하는 100 μ M의 flunarizine을 처리하였을 때 55% 정도, Ca^{2+} 의 channel blocker인 0.1 mM diltiazem을 처리하였을 때 45% 정도 효소 활성이 각각 감소하였다(Table 1). 이같은 결과는 Chcong 등(1991)의 보고에서와 같이 세포내의 Ca^{2+} 의 작용을 억제

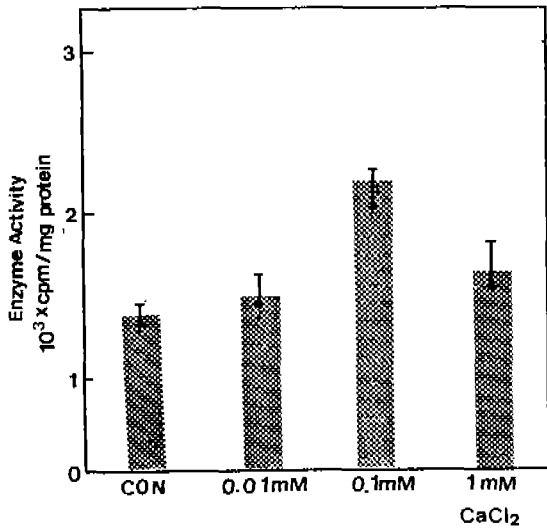


Fig. 3. The effect of Ca²⁺ on β -glucan synthetase II activity in hairy root induced from potato tuber. The hairy root was incubated for 4 h at 27°C in MS medium treated CaCl₂.

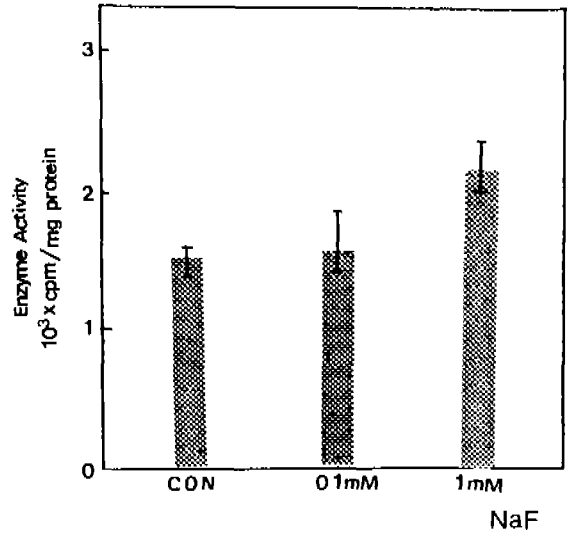


Fig. 4. The effect of sodium fluoride (NaF) on GS II activity in hairy root induced from potato tuber. The hairy root was incubated for 4 h at 27°C in MS medium treated NaF.

Table 1. The effects of diltiazem and flunarizine on GS II activity in potato hairy root. The hairy root was incubated for 4 h at 27°C in MS medium

Treatment	GS II activity (cpm/mg protein)		
	cpm	% control	
Control	2,309 ± 125	100	
Flunarizine	10 μ M	1,400 ± 80	61
	100 μ M	1,069 ± 112	47
Diltiazem	0.1 mM	1,297 ± 326	56
	1 mM	1,600 ± 249	69

시킴으로써 GS II의 활성이 감소되는 것으로 미루어 보아 Ca²⁺이 세포벽 형성에 관여하는 GS II의 활성을 촉진시킨다는 것을 간접적으로 시사해주고 있다.

한편, GS II의 활성변화 기작을 알아보기 위해 phosphatase의 억제제인 NaF를 처리하여 GS II 활성변화를 측정한다. 결과 1 mM 처리구에서 대조구보다 30% 정도 활성이 촉진되었다(Fig. 4). 이는 NaF가 인산화 과정을 통해 효소의 활성을 변화시킨다는 보고(Paliyath and Pooviah, 1988)를 고려할 때 phosphatase의 활성을 억제함으로써 결국 인산화 과정을 촉진시켜 효소 활성이 증가된 것이라고 사료된다. 따라서 hairy root 배양에 있어서 Ca²⁺은 인산화 과정을 통한 GS II 합성을 촉진시키는 것으로 여겨진다.

Peroxidase 활성. Fig. 5는 형질전환된 hairy root의 발생 단계에 따라 peroxidase 활성을 측정하였다. hairy

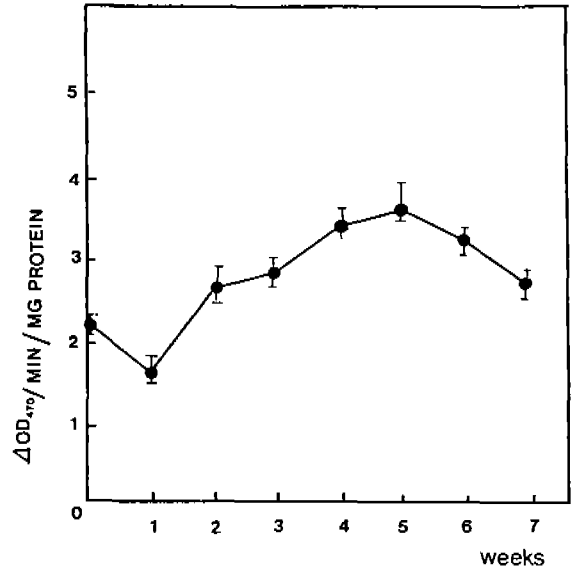


Fig. 5. The changes on activity of peroxidase in hairy root induced by *A. rhizogenes* from potato tuber.

root에서의 peroxidase 활성은 배양 1주에는 다소 활성이 떨어지다가 배양 2주부터 효소활성이 증가하였으나 배양 5주째에는 1.8배 이상 효소활성이 증가하였다. 이러한 활성의 변화는 사시나무의 기관분화, 담배 배양세포의 shoot 형성, Shamout 오렌지 배주 callus의 배형성에서 peroxi-

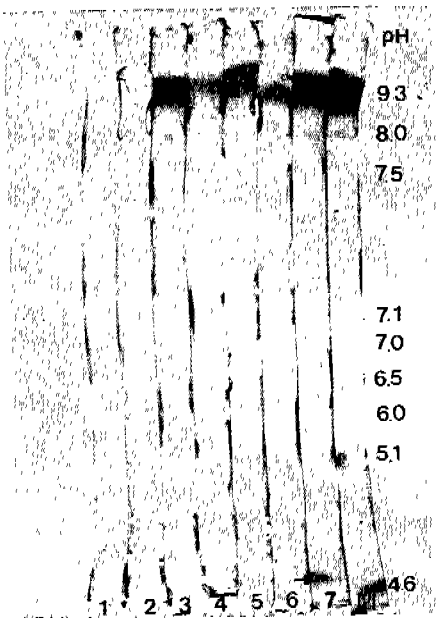


Fig. 6. Isozyme patterns of peroxidase in hairy root induced by *A. rhizogenes* by isoelectric focusing. Lane M, pH marker; Lane 1-7, cultivation periods in suspension culture medium from 1 to 7 weeks; →, new band.

dase 활성의 증가와 일치하고 있어 분화능을 나타내는 하나의 특성으로 계속 분화와 배형성이 유도되고 있음을 보고하였다(Berger *et al.*, 1985, Kochba *et al.*, 1977). 그러나 6주 이상 배양된 hairy root에서는 peroxidase 활성이 감소되었는데 이는 peroxidase가 auxin의 산화에 관여하고 있으며, 특히 auxin이 분화시에 효소 단백질 합성의 전사 과정에 영향을 미친다고 보고(Katsuaki, 1982)를 고려해볼 때 이같은 효소활성 감소는 hairy root 배양시 외부에서의 auxine의 공급이 전혀 없었기 때문으로 사료되나, 앞으로 내재 auxine 함량을 측정하여 비교해야만이 더욱 확실한 결과를 알 수 있으리라 생각된다.

Peroxidase Isozyme 양상. 각 조직에서 조효소원을 추출하여 등전점 전기 영동을 한 다음 peroxidase를 발색시켜 peroxidase isozyme 각각의 등전점을 알아보았다. 1주 배양된 hairy root에서는 pI 7.1과 7.0의 두 band만 나타난 반면 2주 이상 배양된 hairy root에서는 anodic band들이 나타났으며, 4주 배양된 hairy root에서는 pI 6.0, 5.1의 cathodic band가 나타났으며, 배양 7주째에 pI 4.6의 새로운 band가 나타났다(Fig. 6). 이렇게 서로 다른 band 양상은 감자의 peroxidase가 각각 특이한 생리적 작용을 나타내어 식물의 분화와 발생에 영향을 미칠 뿐 아니라 Palatnik 등 (1984)에 의하면 세포내에 존재하는 mRNA들의 adenylation 상태를 변화시킴으로써 peroxidase가 서로 다른 유

전자 발현 조절을 받고 있을 가능성을 시사해 준다. 특히 peroxidase의 활성 변화는 전기영동적 특성의 변화와 일치하여 담배 기관 분화시 전기영동적 특성은 분화가 진행될수록 새로운 band의 수가 증가하고(Kay and Basile, 1987), 이 새로 형성된 band는 shoot나 근분화시에 포함되는 유조직 세포의 발달과 연관된다는 보고(Chandra and Worley, 1973)를 고려할 때 새로운 peroxidase isozyme은 감자의 분화에 주요한 인자로 관여하리라 사료된다.

적 요

감자(*Solanum tuberosum* cv. Dejima) 피경에 *A. rhizogenes*를 접종하여 암소에서 4주 동안 배양한 후 hairy root를 유도하였다. 유도된 hairy root는 opine 분석을 통해 agropine과 mannopine이 검출되어 형질이 전환되었음을 확인하였으며, 이에 따른 생리 생화학적 변화를 알아보기 위하여 peroxidase 활성과 isozyme 양상을 비교 관찰하였다. hairy root의 peroxidase 활성은 배양 5주에서 가장 높았으며, 이 때의 peroxidase isozyme 양상은 3개의 cathodic band와 2개의 anodic band 나타났다. 또한 배양 7주째에 pI 4.6의 새로운 C_4 band가 확인되었다.

한편, hairy root에서 세포벽 형성에 관여하는 β -glucan synthetase II(GS II)에 대한 Ca^{2+} channel blocker인 diltiazem과 flunarizine 처리한 결과 GS II의 활성이 50% 정도 감소되었으나, $CaCl_2$ 처리구에서는 증가하였는데 이는 Ca^{2+} 이 세포벽 형성에 관여하는 요소로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 또한 NaF 처리구에서는 GS II 활성이 30% 증가하였는데 이는 인산화 과정을 통해 활성이 변화됨을 시사해 주고 있다.

참 고 문 헌

- Bates, C.W. and P.M. Ray. 1981. pH dependent interactions between pea cell wall polyamers possibly involved in wall deposition and growth. *Plant Physiol.* **68**: 158-164.
- Berger, R.G., F. Drawert, A. Kinzkofer, C. Kunz and B.J. Radola. 1985. Protein and peroxidase in callus and suspension cultures of apple: A study ultra thin layer isoelectric focusing, sensitive silver staining of proteins and peroxidase isozyme visualization. *Plant Physiol.* **77**: 211-214.
- Cerenius, L. and K. Soderhael. 1984. Isolation and properties of β -glucan synthetase from the aquatic fungus, *Aphanomyces asaci*. *Physiol. Plant.* **60**: 247-252.
- Chandra, G.R. and J.F. Worley. 1973. Effect of 6-benzyladenine on the initiation of adventitious roots on mung bean hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* **14**: 1209-1212.
- Cheong, H.S., Y.H. Kim, B.Y. Pyo, H.S. Kim, S.J. Kim and

- Y.H. Kang. 1991. Changes of peroxidase isozyme pattern and formation of cell wall of hairy root induced by *A. rhizogenes* from potato tuber. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **6**: 27-33.
- Chibba, R.N. and R.B. Van Huystee. 1984. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol.* **75**: 956-958.
- Coppens, L. and E. Gillis. 1987. Isozyme electrofocusing as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis in callus tissues of *Hordeum vulgare* L. *J. Plant Physiol.* **128**: 153-158.
- Gregory, M.G., A.S.N. Reedy and B.W. Poovaiah. 1988. Effect of calcium on cell wall structure, protein phosphorylation and protein profile in senescing apples. *Plant Cell Physiol.* **29**: 565-572.
- Grisson, R. and P.E. Pilot. 1985. Cytoplasmic and isoperoxidase in growing maize roots. *J. Plant Physiol.* **118**: 189-199.
- Johnson-Flanagan, A.M. and J.N. Owens. 1985. Peroxidase activity in relation to suberization and respiration in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seedling roots. *Plant Physiol.* **79**: 103-107.
- Kato, K. 1981. Ultrastructure of the plant cell wall: Biochemical viewpoint. In, *Encyclopedia of Plant Physiology, Plant Carbohydrates II. New Series Vol. 13B*. Springer Verlag Press. pp. 36-57.
- Katsuaki, I. 1982. Isozyme polymorphism of peroxidase of Eucalyptus callus in relation to plant hormone contents. In, *Plant Tissue Culture*, A. Fujiwara (ed.). pp. 215-216.
- Kay, L.E. and D.V. Basile. 1987. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol.* **84**: 99-105.
- Kochba, J., A. Laavee and P. Spiegel-Roy. 1977. Differences in peroxidase activity and isozyme in embryogenic and nonembryogenic 'Shamout' orange ovular callus lines. *Plant Cell Physiol.* **18**: 463-467.
- Lee, J.S., T.J. Mulkey and M.L. Evans. 1983. Gravity-induced polar transport of calcium across root tips of maize. *Plant Physiol.* **73**: 874-876.
- Levin, B.A. and D.D. Dalgarno. 1983. The dynamic and function of calcium binding proteins. *Biochem. Biophys. Acta* **726**: 187-201.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Palatnik, C.M., C. Wilkins. and A. Jacobson. 1984. Translational control during early *Dictyostelium* development: Possible involvement of poly(A) sequences. *Cell* **36**: 1017-1025.
- Paliyath, G. and B.W. Poovaiah. 1988. Promotion of β -glucan synthase activity in corn microsomal membranes by calcium and protein phosphorylation. *Plant Cell Physiol.* **29**: 67-73.
- Pedreno, M.A., F. Sabater, R. Munoz and F. Garoia-carmona. 1987. Effect of different phenol on the NADH-oxidation catalyzed by a peroxidase from lupin. *Phytochemistry* **26**: 3133-3136.
- Petit, A.A., A. Berkaloff and J. Tempe. 1986. Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 388-393.
- Seeni, S. and A. Gnanam. 1981. Isozyme of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD⁺-malate dehydrogenase in shoot forming foliar discs of tobacco. *Plant Cell Physiol.* **22**: 969-977.
- Stegeman, H. and W. M. Pakr. 1979. Rice protein patterns. Comparison by various PAGE-technique in slabs. *A. Acker. Dflanzen.* **148**: 446-454.
- Stoddart, R.W. and D.H. Narthcote. 1987. Metabolic relationships of the isolated fractions of pectic substance of activity growing sycamore cells. *Biochem. J.* **105**: 45-49.
- Ueng, P.P. and J.M. Daly. 1985. Comparison of indole-3-acetic acid oxidation in peroxidase from rust-infected resistant wheat leaves. *Plant Cell Physiol.* **26**: 77-87.
- Veluthambi, K. and B.W. Poovaiah. 1984. Polyamine-stimulated phosphorylation of proteins from corn coleptiles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **122**: 1374-1380.
- Wetter, L. and J. Dyck. 1983. Isozyme analysis of cultured cells and somatic hybrids. In, *Handbook of Plant Cell Culture*. pp. 607-628.