

당근(*Daucus carota* L.)배양세포의 DNase활성에 미치는 Polyamines의 영향

尹美貞·康榮燾
(延世大學校 理科學 生物學科)

The Effect of Polyamines on the DNase Activity in Cultured Carrot Cells

Yoon, Michung and Young Hee Kang
(Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

The present study was attempted to investigate the effects of polyamines such as putrescine, spermidine and spermine on protein content and DNase activity *in vivo* and *in vitro* in carrot embryos. It was also investigated whether polyamines could replace role of cations required for DNase activity *in vitro*. The results obtained are as follows.

Putrescine, spermidine and spermine increased protein content, although response to spermine reached plateau at the concentration of 0.1 mM. DNase activity was inhibited by polyamines, the inhibition being concentration-dependent and the highest at the concentration of 10 mM. The inhibition of DNase activity was the most prominent with spermine. Similar inhibitory effect of polyamines which was concentration-dependent was found in DNase activity but no change was shown on time-course *in vitro*. Putrescine and spermidine enhanced the DNase activity at low Mg^{2+} and Mn^{2+} concentrations, suggesting that the role of Mg^{2+} and Mn^{2+} for DNase activity could be, in part, replaced by these polyamines.

These results, therefore, suggest that polyamines can modulate DNase activity through binding to DNA rather than direct effect on DNase activity.

서 론

Polyamines은 모든 식물에 널리 존재하며 성장 촉진에서 노화 억제에 이르기까지 그 작용이 다양하여 식물 성장 조절 물질로 인정되고 있다. Polyamines이 성장에 관여한다는 사실은 일찍부터 연구되었는데 *Helianthus tuberosus*에서 putrescine, cadaverine, spermidine 및 spermine이 10^{-5} M에서 성장을 촉진하고(Smith *et al.*, 1979; Bagni *et al.*, 1981), wheat germ cell-free system에서 spermidine이 단백질 합성을 촉진하며(Igarishi *et al.*, 1981), tuber sprouting (Kaur-Sawhney *et al.*, 1982)시 세포 분열을 증가시키는 것으로 알려져 있

다. 따라서 분화의 한 단계인 배형성시에도 배내의 물질대사에 영향을 미칠 것으로 생각되어진다. 실제로 polyamines이 globular stage의 단계를 연장시켜 단백질 합성을 왕성하게 일으키는 것으로 보고되어 있다(Bradley *et al.*, 1984). 또한 polyamines은 식물에서 RNase와 protease의 활성을 저하시켜 노화를 억제·지연시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며(Altman *et al.*, 1977; Galston *et al.*, 1978; Kaur-Sawhney *et al.*, 1977; Kaur-Sawhney and Galston, 1979), 식물체의 여러 조직에서 엽록소의 파괴를 방지하고, 세포막을 안정시키는 작용을 한다고 하였다(Altman, 1982; Cohen *et al.*, 1979; Kaur-Sawhney and Galston, 1979; Naik and Srivastava, 1978; Popovic *et al.*, 1979). 그리고 polyamines의 선구물질인 L-arginine은 귀리 잎의 원형질체에서 DNase의 활성을 억제하며(Kaur-Sawhney *et al.*, 1977), 주로 미생물과 동물에서 DNase에 대한 polyamines의 작용이 보고되어 있다(Frisch-Niggemeyer and Hoffmann-Ostenhof, 1957; Stevens, 1970). 이러한 polyamines의 작용은 음전하를 띤 핵산이나 세포막과 결합하여 핵산과 세포막을 안정시키고(Bachrach and Eilon, 1969; Suwalski *et al.*, 1969), 핵산의 합성 및 분해에 직접 관여하는 등의 메카니즘에 의하여 이루어진다고 생각되고 있다(Bachrach, 1973; Cohen, 1971; Karpetsky *et al.*, 1977).

DNase나 protein kinase와 같은 효소는 활성도와 안정을 위해 양이온을 필요로 하는데, wheat germ protein kinase의 경우 Mg^{2+} 이 없거나 저농도일 때 putrescine과 spermidine이 이 효소의 활성을 상당히 증가시켜 부분적으로 Mg^{2+} 의 효과를 대신할 수 있다고 보고되어 있다(Yan and Tao, 1982).

그러나, 위와 같은 DNase의 활성에 대한 polyamines의 영향은 모두 동물과 미생물에서 얻어진 것이므로 식물에서 어떠한 영향을 나타내는가를 규명하기 위하여 조직배양을 이용하여 세포 수준에서 본 실험을 하였다.

재료 및 방법

배의 형성 및 시약. 당근(*Daucus carota* L.)뿌리의 형성층 부위에서 작은 절편을 만들어 70% ethanol에서 1분, 5% sodium hypochlorite에서 10분간 멸균한 다음 멸균 증류수로 3회 세척하여 1-B5배지에서 callus를 유도하여(Reinert *et al.*, 1971) 2주 간격으로 계대 배양하였다. 한천 배지에서 계대 배양한 callus를 성장 조절제로서 2, 4-D만 첨가한 액체 배지로 옮겨 120 rpm으로 진탕 배양하여 10일 간격으로 계대 배양하였다. 생성된 세포를 2층의 stainless-steel sieve를 통과시켜 직경이 37~63 μm 인 세포를 모은 다음 2, 4-D를 첨가하지 않은 배양액으로 여러번 세척한 후 이때 생성된 pellet 1 μl 에 1 ml 배양액을 첨가하여 cell density를 맞추고 2, 4-D가 없는 배양액에서 resuspension시켜 배를 형성하였다(Kamada and Harada, 1979). Putrescine, spermidine, spermine, calf thymus DNA (type V, highly polymerized), bovine serum albumin은 sigma사 제품을 사용하였다.

실험구의 설정. 단백질 양의 변화를 위한 실험에서는 배를 형성하는 현탁 배양액에 putrescine, spermidine 및 spermine을 각각 0.1 mM, 1 mM, 10 mM 첨가한 것을 농도별 실험구로, 1 mM 첨가하여 배 발생 0, 4, 7, 10일 째에 측정할 것을 시간별 실험구로 하였다. DNase 활성의 경우, 생체내 실험에서는 putrescine, spermidine 및 spermine을 각각 0.1 mM, 1 mM, 10 mM 첨가한 것을 농도별 실험구로, 10 mM 첨가한 것을 시간별 실험구로 설정하였으며,

시험관내 실험에서는 DNA용액에 putrescine, spermidine 및 spermine을 각각 0.1 mM, 1 mM, 10 mM 첨가한 것을 농도별 실험구로, 10 mM 첨가한 것을 시간별 실험구로 설정하였다. 양이온 대치효과를 규명하기 위한 실험에서는 양이온 Mg^{2+} , Mn^{2+} 을 사용하였고, 이들 양이온(Mg^{2+} , 0~9 mM; Mn^{2+} , 0~6 mM)의 농도를 변화시키면서 putrescine과 spermidine을 0.01 mM 첨가한 것을 실험구로 하였다. 대조구로는 polyamines을 첨가하지 않은 것을 사용하였다.

DNase추출 및 활성도 측정. DNase의 추출 및 활성도 측정은 Naito등(1979)의 방법을 수정하여, 배 0.5 g을 ice cold 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5)에서 homogenation한 후, homogenate에 같은 buffer를 첨가하여 8 ml로 만들었다. 20,000×g, 0~2°C에서 30분간 원심분리하여(Hitachi, Model 20 PR-5, Automatic High Speed Centrifuge with RPR 20-3-408 rotor) 얻어진 상등액을 crude DNase 추출액으로 사용하였다. 2 ml의 crude DNase 추출액에 0.05 M phosphate buffer(pH 6.5)에 녹인 calf thymus DNA용액 0.5 ml와 0.5 ml의 $MgCl_2$ (2.0 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 4시간 반응시켰다. 시험관내 실험에서는 0.5 ml의 DNA용액과 각 polyamine용액을 37°C에서 6시간 반응시킨 후 0.5 ml의 $MgCl_2$ 와 2 ml의 crude DNase 추출액을 첨가하여 반응시켰다. 반응 증지를 위하여 0.5 ml의 25% $HClO_4$ 를 첨가한 다음 2시간 이상 0°C에서 방치한 후 2,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 Hitachi, Model 200-20 double beam spectrophotometer를 사용하여 260 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 효소의 1 unit는 분해된 DNA의 260 nm에서 흡광도가 0.1일 때로 정의하였다. 단백질 정량은 Lowry등(1951)의 방법을 수정하여 정량하였으며, 배의 관찰은 automatic camera가 부착된 Nikon phase-contrast microscope (CF phase objects and phase-contrast turret condenser N.A. 1.25×100)을 사용하여 시행하였다.

결과 및 고찰

배의 형태적 관찰. Fig. 1은 당근의 진탕 배양세포를 2,4-D가 없는 배양액으로 옮겼을 때 생성된 배를 위상차 현미경을 사용하여 날짜별로 관찰한 것이다. 1, 2, 3, 4는 각각 배발생 0, 4, 7, 10일째의 것으로 1은 배발생 적전에 단세포 상태로 있거나 몇 개의 세포가 모여있고 세포들은 둥근 모양을 하고 있으며, 2는 heart모양의 메가 형성되었고, 3에서는 heart모양의 세포가 약간 길어지거나 구부러져 있으며, 4는 세포가 상당히 신장되어 있는 것을 볼 수 있었다.

농도와 Age에 따른 단백질 양의 비교. Fig. 2는 각 polyamine을 0.1 mM, 1 mM, 10 mM 첨가하여 배발생 4일째에 농도별 단백질 양의 변화를 나타낸 것이다.

농도별 실험구에서는 대조구에 비해서 단백질 양이 증가하였으며, putrescine과 spermidine은 고농도로 갈수록 그 효과가 증가하였으나, spermine만은 0.1 mM이상의 고농도에서 그 효과가 감소하였다. polyamine처리구의 단백질 양은 putrescine과 spermidine이 0.1 mM에서 38~58%, 1 mM에서 60~100%, 10 mM에서 82~180%의 증가를 나타냈으며, spermine은 고농도로 갈수록 낮은 증가율을 보여주었다.

Fig. 3은 배의 단백질 양을 age에 따라 조사한 것으로 putrescine, spermidine 및 spermine을 각각 1 mM씩 첨가하여 배발생 0, 4, 7, 10일째에 측정된 것이다. 이때 각 1 mM씩 첨가

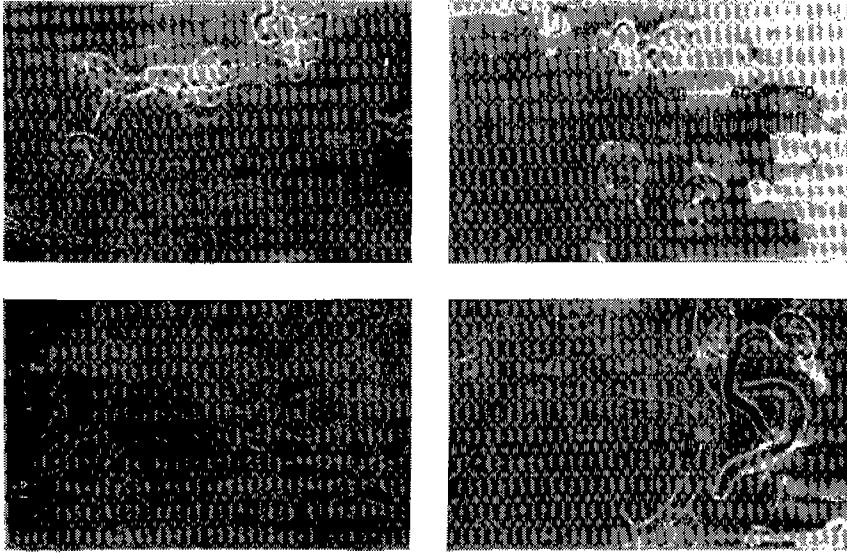


Fig. 1. Somatic embryogenesis in cultures of *Daucus carota* L. ($\times 100$) (1) Young globular stage at day 1; (2,3) Heart stage at days 4 and 7; (4) Torpedo stage at day 10.

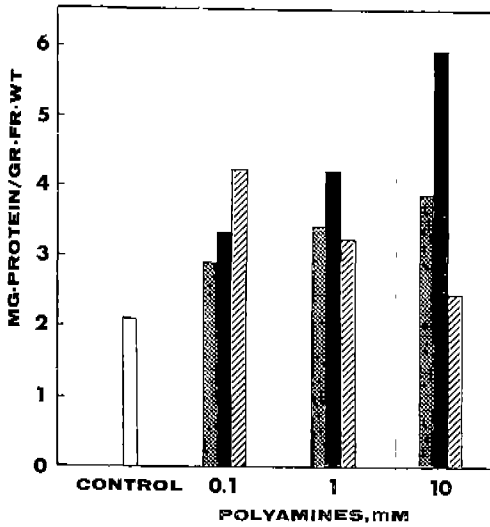


Fig. 2. Dependence of protein content of cultured carrot cells on various concentrations of putrescine (▨), spermidine (■) and spermine (▩) after 4 days of embryogenesis.

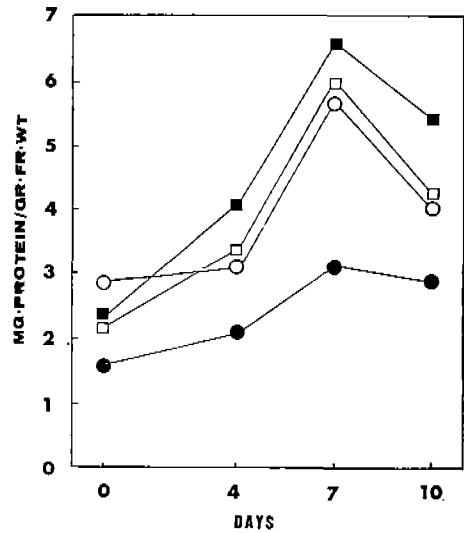


Fig. 3. Dependence of protein content of cultured carrot cells at various ages during embryogenesis on putrescine, spermidine and spermine. Polyamines used are 1 mM. control (●); putrescine (○); spermidine (■); spermine (□).

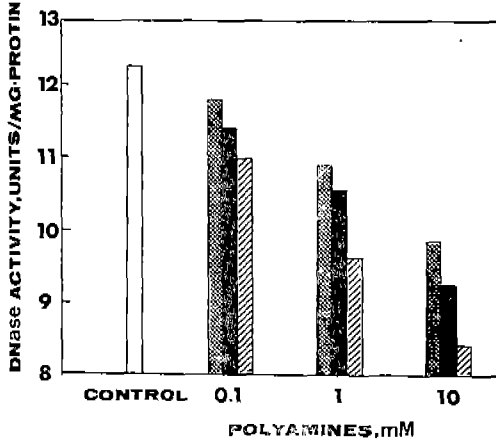


Fig. 4. Dependence of DNase activity on various concentrations of putrescine (□), spermidine (■) and spermine (▨) after 4 days of embryogenesis.
* One unit of enzyme was defined as an absorbance of 0.1 at 260 nm.

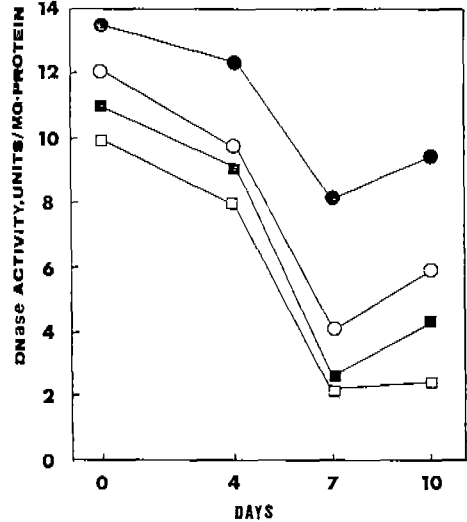


Fig. 5. Inhibition of DNase activity in cultured carrot cells at various ages during embryogenesis by putrescine, spermidine and spermine. Polyamines used are 10 mM.
* One unit of enzyme was defined as an absorbance of 0.1 at 260 nm. control (●); putrescine (○); spermidine (■); spermine (□).

한 것은 농도별 실험구에서 단백질 양의 차가 적게 나타나고, 동시에 증가율이 높은 농도이기 때문이다. 또한 배 발생 기간동안 날짜가 경과함에 따라 대조구와 실험구에서 모두 단백질 양이 증가하다가 7일 이후에는 감소하는 경향을 나타냈다. 이때 대조구에 비해 실험구가 좀 더 높은 증가를 나타냈고, 특히 spermidine은 7일에 대조구에 비해 2배 이상의 증가를 나타냈다.

Polyamines은 일반적으로 조직과 기관에서 왕성하게 세포증식을 증가시키고, 식물이나 동물의 tumor cell과 같은 성장률이 높은 조직에서 다량 검출된다는 점에서 성장촉진과 밀접한 관계를 가지는 것으로 생각되며(Russell, 1973), 또한 단백질 합성을 증가시킨다는 보고가 있고(Kaur-Sawhney *et al.*, 1980; Igarish *et al.*, 1981; Altman *et al.*, 1977), 단백질 합성에 영향을 줄 수 있는 여러가지 핵산과 서로 작용하는 것으로 나타나 있다(Altman and Bachrach, 1981). 따라서 왕성한 세포증식이 일어나는 배 발생 시기에서는 단백질 합성에 미치는 polyamines의 효과가 크게 나타나는 것으로 사료된다.

Polyamines의 농도와 age에 따른 DNase 활성도 비교. Fig. 4는 각 polyamine을 0.1 mM, 1 mM, 10 mM 첨가하여 배 발생 4일째의 DNase 활성을 농도별로 나타낸 것으로 농도가 높아질 수록 효소의 활성이 더욱 저하되었다. 대체로 polyamines 처리구의 활성은 대조구에 비해 상당히 억제되었는데, 0.1 mM에서 4~11%, 1 mM에서는 12~22.5%, 10 mM에서 20.7~35%로 고농도로 갈수록 억제정도가 심했다. 이들 polyamines중 spermine은 가장 큰

억제효과를 나타냈으며 putrescine의 영향이 가장 적었다.

Fig. 5는 각 polyamine중 가장 높은 억제효과를 나타낸 10 mM씩 첨가하여 배 발생 10일 간에 걸쳐 DNase 활성을 측정된 것이다. 이때 polyamines을 첨가한 실험구가 대조구에 비해 활성도가 낮았으며, 배 발생 4일째까지는 약간의 차이를 보이다가 7일째에는 가장 높은 억제도를 나타낸 spermine의 경우 대조구와 6 units 이상의 차이를 나타냈다. 7일째에 putrescine을 첨가한 실험구는 대조구에 비해 49.7%의 활성을, spermidine은 29.7%, spermine은 27.8%를 나타냈다.

이렇게 spermine이 spermidine이나 putrescine에 비해 억제효과가 크게 나타나는 것은 생체내에서 putrescine이 spermidine으로, spermidine이 spermine으로 전환되어 작용하기 때문으로 생각되며 putrescine은 diamine이고 spermidine, spermine은 각각 triamine, tetraamine이므로 amine의 수 즉, 전하량과 관계되어 그 작용이 강한 것으로 생각된다. Kaur-Sawhney 등(1977)은 polyamines의 전구물질인 arginine을 첨가했을때 polyamines보다는 적지만 DNase 활성이 감소하는 것은 이러한 전구물질이 polyamines으로 전환되어 작용하기 때문이라고 보고하였다. 또한 polyamines의 농도가 높을수록 DNase의 활성이 낮아지는 것은 polyamines이 DNA와 결합하기 때문으로 생각되며, 7일째의 DNase의 활성이 가장 심하게 억제되는 것은 7일째에 단백질 양이 가장 높았던 것과 일치한다.

시험관 내에서의 polyamines의 농도와 age에 따른 DNase 활성도 비교. Table 1은 0.1 mM, 1 mM, 10 mM의 polyamines을 DNA와 6시간 반응시킨 다음 4일째의 배에서 추출한 DNase를 첨가하여 DNase 활성의 변화를 본 것으로 polyamines의 농도가 높을수록 DNase의 활성이 낮았으며 spermine이 가장 효과적이었다. 0.1 mM 첨가구에서는 putrescine은 DNase 활성도를 3.8%, spermidine은 9.6%, spermine은 17.5% 억제하였으며, 1 mM 첨가구에서는 putrescine은 19.3%, spermidine은 23.7%, spermine은 42%의 억제도를 나타냈고, 10 mM 첨가구에서는 putrescine은 36.4%, spermidine은 39.4%를 억제했고 spermine은 74.8%의 억제도를 나타냈다.

Table 2는 각 polyamine을 10mM씩 첨가하여 DNA와 반응시킨 후 4일째의 DNase를 첨가하여 0, 1, 3, 6시간씩 반응시켜 DNase 활성의 변화를 나타낸 것으로 대조구에 비해 실험구에서 활성이 감소하였으나 0시간 반응시킨 것과 장시간 반응시킨 것에는 DNase 활성의 차이를 나타내지 않았다. Putrescine 처리구는 대조구에 비해서 63.6~65.8%, spermidine 처리구는 60.6~61.8%, spermine 처리구는 25.2~29.4% 정도의 DNase 활성도를 나타냈

Table 1. Effects of various concentrations of putrescine, spermidine and spermine on *in vitro* DNase activity after 4 days of embryogenesis

Treatments (mM)	DNase activity ($A_{260}/\text{mg}\cdot\text{protein}$)		
	Putrescine	Spermidine	Spermine
0	1.006 (100.0)	1.006 (100.0)	1.006 (100.0)
0.1	0.968 (96.2)	0.909 (90.4)	0.830 (82.5)
1	0.812 (80.7)	0.768 (76.3)	0.575 (57.2)
10	0.640 (63.6)	0.610 (60.6)	0.253 (25.2)

* Percentages of controls shown in parenthesis.

Table 2. Effects of putrescine, spermidine and spermine on *in vitro* DNase activity after 4 days of embryogenesis

Treatments (10 mM)	DNase activity ($A_{260}/\text{mg}\cdot\text{protein}$)			
	0 hr	1 hr	3 hr	6 hr
Control	1.006 (100.0)	1.008 (100.2)	1.084 (107.8)	1.112 (110.5)
Putrescine	0.640 (63.6)	0.647 (64.3)	0.650 (64.6)	0.662 (65.8)
Spermidine	0.610 (60.6)	0.612 (60.8)	0.616 (61.2)	0.622 (61.8)
Spermine	0.253 (25.2)	0.263 (26.1)	0.272 (27.0)	0.296 (29.4)

* Percentages of control at 0 hr shown in parenthesis.

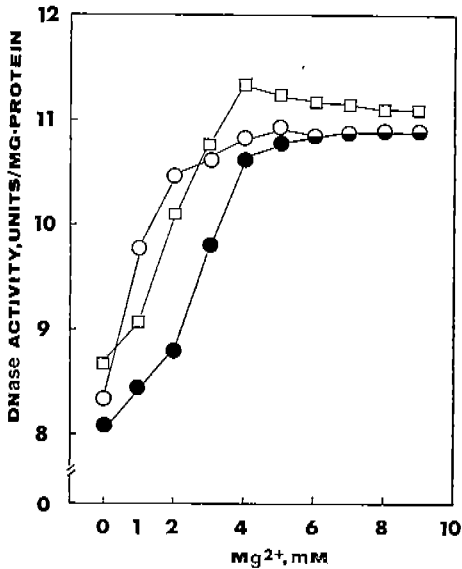


Fig. 6. Effects of putrescine and spermidine on DNase activity at various Mg^{2+} concentrations. Polyamines used are 0.01 mM. * One unit of enzyme was defined as an absorbance of 0.1 at 260 nm. control (●); putrescine (○); spermidine (□).

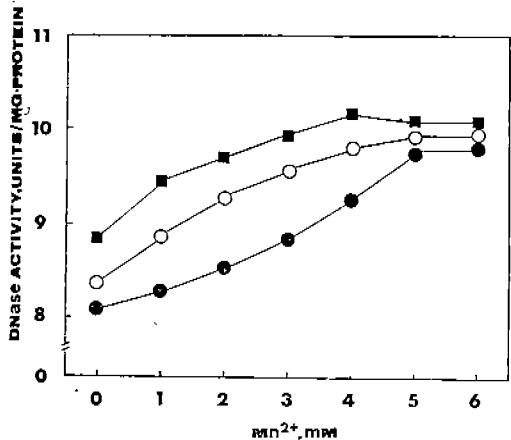


Fig. 7. Effects of putrescine and spermidine on DNase activity at various Mn^{2+} concentrations. Polyamines used are 0.01 mM. * One unit of enzyme was defined as an absorbance of 0.1 at 260 nm. control (●); putrescine (○); spermidine (■).

으며, spermine의 영향이 가장 현저하였다.

Polyamines는 세포내의 pH 범위에서 양전하를 띠고 있어서 DNA나 RNA의 인산기와 강하게 결합하게 되며(Bachrach, 1973; Bagni and Fracassini, 1973; Cohen, 1971; Stevens, 1969), 이러한 polyamines과 핵산과의 결합이 핵산을 안정시켜서 nuclease의 작용으로부터 보호해준다고 하였다(Mitra and Kaesberg, 1963; Stevens, 1970). 본 실험의 결과에서 polyamines의 농도가 높을수록 DNase 활성화에 대한 억제효과가 크게 나타난 것은 polyamines와 DNA와의 결합결과 관련이 있는 것으로 생각되며 spermidine이나 putrescine보다는 spermidine의 효과가 더 높은 것은 DNA와 결합하는 polyamines의 전하와 관련된다고 생각된다. 또한 0시간 반응한 것과 장시간 반응한 것의 DNase 활성의 차이가 없는 것은 polyamines

가 DNA에 직접 작용한다는 것을 나타낸다.

DNase 활성에 대한 양이온(Mg^{2+} , Mn^{2+}) 대체효과. 또한 효소의 활성 측정시 polyamines이 양이온인 Mg^{2+} 의 효과를 부분적으로 대체할 수 있다는 가능성을 조사하여 Fig. 6의 결과를 얻었다. Mg^{2+} 의 농도를 0에서 9 mM까지 변화시키면서 DNase 활성을 억제하지 않는 농도인 0.01 mM의 putrescine과 spermidine을 첨가시킨 것을 실험구로 하였다. Mg^{2+} 가 없거나 그의 농도가 낮을 때 putrescine을 첨가하면 효소의 활성이 증가되었고, spermidine은 DNase의 활성을 좀 더 증가시켰다. 그러나 Mg^{2+} 의 농도를 증가시키면 따라 putrescine의 효과는 감소하였고 spermidine으로도 같은 결과를 얻었다.

Fig. 7은 Mn^{2+} 의 농도를 0에서 6 mM로 변화시키면서 DNase 활성을 억제하지 않는 농도인 0.01 mM의 putrescine과 spermidine을 첨가하여 조사된 것인데 Mg^{2+} 를 cofactor로 사용한 Fig. 6의 결과보다 활성은 낮았지만 비슷한 경향을 나타냈다. 즉, Mn^{2+} 이 없거나 낮은 농도일 때 putrescine과 spermidine을 첨가하면 DNase 활성이 상당히 증가되었고 Mn^{2+} 의 농도가 증가되면 오히려 이들의 효과가 감소하였다. 따라서 polyamines이 DNase 활성에 대하여 양이온의 효과를 부분적으로 대체하는 것으로 사료된다.

적 요

당근(*Daucus carota* L.) 배양재배 배 형성시 putrescine, spermidine 및 spermine은 농도가 증가함에 따라 탄피질 양을 증가시켰다. DNase 활성에 있어서는 polyamines이 전반적으로 그 활성을 억제하였는데, 10 mM의 농도에서 가장 큰 억제효과를 나타내었으며 특히 spermine이 가장 큰 억제도를 나타냈다. 시험관 내에서의 DNase 활성도 비교는 위의 생체내 실험과 비슷한 결과를 나타냈으나 반응시간에 따른 DNase 활성에는 변화에 없었다. 또한 Mg^{2+} 와 Mn^{2+} 의 농도가 낮을 때, putrescine과 spermidine은 DNase 활성도를 증가시켰다. 그러므로 이상과 같은 결과들은 polyamines이 DNA와 직접 작용하여 DNase 활성을 조절할 수 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

- Altman, A. 1982a. Retardation of radish leaf senescence by polyamines. *Physiol. Plant.* 54: 189-193.
- Altman, A. 1982b. Polyamines and wounded storage tissues-Inhibition of RNase activity and solute leakage. *Physiol. Plant.* 54: 194-198.
- Altman, A. and U. Bachrach. 1981. Involvement of polyamines in plant growth and senescence. In *Advances in Polyamine Research* (Eds, Calderara *et al.*), vol. 3, pp. 365-375. Raven Press, New York.
- Altman, A., R. Kaur-Sawhney, and A.W. Galston. 1977. Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol.* 60: 570-574.
- Bachrach, U. 1973. Function of naturally occurring polyamines. Academic Press, New York.
- Bachrach, U. and G. Eilon. 1969. The effect of spermine and oxidized spermine on the enzymic degradation of DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 179: 494-496.
- Bagni, N. and D.S. Fracassini. 1973. The role of polyamines as growth factors in higher plants and their mechanism of action. In *Plant Growth Substances*. pp. 1205-1217. Hirokawa Publishing Co., Tokyo.

- Bagni, N., D.S. Fracassini, and P. Torrigiani. 1981. In *Advances in Polyamine Research* (Eds, Calderara *et al.*), vol. 3, pp. 377-388, Raven Press, New York.
- Bradley, P.M., F. El-Fiki, and K.L. Giles. 1984. Polyamines and arginine affect somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Sci. Lett.* 34: 397-401.
- Cohen, A.S., R.B. Popovic, and S. Zalik. 1979. Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity, and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. *Plant Physiol.* 64: 717-720.
- Cohen, S.S. 1971. Induction to the polyamines. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey
- Frisch-Niggemeyer, W. and O. Hoffmann-Ostenhof. 1957. Die beeinflussung von desoxyribonucleasen verschiedener herkunft durch bestimmte aminosauern und diamine. *Biokhimiya* 22: 404-408.
- Galston, A.W., A. Altman, and R. Kaur-Sawhney. 1978. Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat protoplasts. *Plant. Sci. Lett.* 11: 69-79.
- Jgarishi, K., K. Kashiwagi, T. Kakegawa, R. Aoki, and S. Hirose. 1981. Increase of degree of spermidine stimulation of polypeptide synthesis in the presence of phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 207: 128-134.
- Kamada, H. and H. Harada. 1979. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. *Z. Pflanzenphysiol.* 91: 255-266.
- Karpetsky, T.P., P.A. Hieter, J.J. Frank, and C.C. Levy. 1977. Polyamines, ribonucleases, and the stability of RNA. *Mol. Cell Biochem.* 17: 89-99.
- Kaur-Sawhney, R., and A.W. Galston. 1979. Interaction of polyamines and light on biochemical processes involved in leaf senescence. *Plant Cell Environ.* 2: 189-196.
- Kaur-Sawhney, R., H.H. Flores, and A.W. Galston. 1980. Polyamine-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 65: 368-371.
- Kaur-Sawhney, R., L. Shin, and A.W. Galston. 1982. Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. *Plant Physiol.* 69: 411-415.
- Kaur-Sawhney, R., W.R. Jr. Adams, J. Tsang, and A.W. Galston. 1977. Leaf pretreatment with senescence retardants as a basis for oat protoplast improvement. *Plant Cell Physiol.* 18: 1309-1317.
- Naito, K., Iida, H. Suzuki, and H. Tsuji. 1979. The effect of benzyladenine on changes in nuclease and protease activities in intact bean leaves during aging. *Physiol. Plant.* 46: 50-53.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mitra, S. and P. Kaesberg. 1963. Interaction of polyamines with turnip yellow mosaic virus RNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 11: 146-151.
- Naik, B.I. and S.K. Srivastava. 1978. Effect of polyamines on tissue permeability. *Phytochemistry* 17: 1885-1887.
- Popovic, R.B., D.J. Kyle, A.S. Cohen, and S. Zalik. 1979. Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barley leaf discs. *Plant Physiol.* 64: 721-726.
- Reinert, J., D. Becks-Hüsemann, and H. Zerman. 1971. Dertermination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*. In *Les cultures de tissu plantes*, pp. 261-268. Paris: Colloques Internationaux du C.N.R.S. no. 193.

- Russell, D.H. 1973. Polyamines in normal and neoplastic growth. Raven Press, New York.
- Smity, T.A., N. Bagni, and D.S. Fracassini. 1979. *In* Nitrogen assimilation of plants. (Eds. Hewitt, E.J. and C.V. Cutting) pp. 557-570. Academic Press, London.
- Stevens, L. 1970. The biochemical role of naturally occurring polyamines in nucleic acid synthesis. *Bot. Rev.* 45: 1-27.
- Stevens, L. 1969. The binding of spermine to the ribosomes and ribonucleic acid from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. J.* 113: 117-121.
- Suwalsky, M., W., W. Traub, and U. Shmueli. 1969. An X-ray study of the interaction of DNA with spermine. *J. Mol. Biol.* 42: 363-373.
- Yan, T.F.J. and M. Tao. 1982. Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. *J. Biol. Chem.* 257(12): 7037-7043.

(1986. 10. 25 接受)