

Spermidine이 배추 잎 원형절편의 노쇠과정에 미치는 효과

申 靜 林·洪 英 男
(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Effects of Spermidine on the Senescence in Leaf Discs of Chinese Cabbage

Shin, Jeong Lim and Young-Nam Hong
(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

The rapid senescence of detached Chinese cabbage leaf discs in darkness is first manifested by a sharp rise in malondialdehyde content (indicated by disruption of membrane structure), then by a rise in peroxidase activity and a decrease in catalase activity, and ultimately by chlorophyll degradation. These changes in parameters besides the catalase activity during senescence were delayed by application of spermidine. Especially, 10^{-4} M spermidine almost completely arrested chlorophyll degradation after incubation over 5 days. Spermidine reduced the amount of ethylene produced by senescing leaf discs. Additionally, it also reduced IAA-induced ethylene production. Calcium ion (1 mM, 10 mM) supplied together with the spermidine diminished the spermidine action, indicating probable involvement of an initial ionic attachment mechanism. These results suggest that spermidine can be used as an anti-senescence agent for plants and that this agent may stabilize membrane structure through interaction with the negatively charged loci on the membrane and exert the influence during senescence.

서 론

식물체의 발달단계중 노쇠현상은 성숙된 세포에서 적절한 시기에 자연적으로 진행되지만 외부의 여러 요인들에 의해 인위적으로 유도될 수 있다 (Thomas and Stoddart, 1980). 특히 노쇠현상에 대해 생장조절물질이나 대사물질의 효과를 연구하기 위해 잎 조직을 떼어내어 노쇠현상을 인위적으로 유도하는데, 이 때 일어나는 현상도 자연적인 노쇠과정과 유사함이 보고된 바 있다 (Hurkman, 1979).

노쇠과정에 따른 일반적인 변화에는 세포막 구조의 파괴로 인한 막기능의 손실 (Benveniste, 1978; Pooviah and Leopold, 1976; Van Steveninck, 1975), 핵산 및 고분자물질의 파괴 (Thimann, 1980), 여러 가수분해 효소들의 활성증가 (Borchert, 1978; Frith and Dalling, 1980;

본 연구는 1986~1988년도 과학재단 기초연구 지원비로 이루어진 것임.

Martin and Thimann, 1972; Pitt and Galpin, 1971), 이외에 식물체에서만 특이하게 나타나는 구조적 기능적인 변화로서 엽록체의 파괴 및 빠른 에틸렌 방출 (Yang and Pratt, 1978) 등이 포함된다. 이와같은 일련의 사건들은 여러 성장조절물질에 의해 조절될 수 있다는 보고들이 있다 (Thimann, 1980).

동물, 식물 및 미생물 등 모든 세포에 존재하는 polyamine (PA)은 식물의 성장과 발달에 있어서 생리적 조절능력을 보여줌으로써 식물성장조절물질로 인정받고 있다 (Galston, 1983). 분열능력이 높은 세포일 수록 PA함량이 높으며 (Teitel *et al.*, 1985), 노쇠되어가는 세포내에는 그 함량이 감소된다는 보고 (Galston and Kaur-Sawhney, 1982)와 종자가 발아하거나 근경에서 싹이 틀 때 PA함량이 급격히 증가 (Kaur-Sawhney *et al.*, 1982; Villanueva *et al.*, 1978)를 뿐 아니라 배양된 당근세포에서 배발생을 유도할 때 PA함량 (Bradley *et al.*, 1984) 및 그의 합성효소인 arginine decarboxylase 활성도가 증가된다 (Galston and Kaur-Sawhney, 1980)는 보고들은 세포분열능력, 성장 및 분화 등과 같은 여러 범위의 생리적 현상과 세포내의 PA함량의 증가와는 상관관계가 있음을 보여준다.

한편, 외부 자극에 대한 대사 변화에도 관여한다는 보고들이 있다 (Altman, 1982; Altman *et al.*, 1982; Kaur-Sawhney and Galston, 1979; Shevyakova *et al.*, 1985; Smith, 1985). 특히, 여러 단자엽 식물에 있어서 잎절편과 쌍자엽 식물의 잎원형절편에 PA처리 후 48시간 동안 암처리하였을 때 엽록소의 손실을 거의 억제시켰다는 보고 (Kaur-Sawhney and Galston, 1979; Cohen *et al.*, 1979; Kar *et al.*, 1986)와 분리된 원형질체의 생존력을 유지 (Altman *et al.*, 1977; Galston, 1978)시켰을 뿐 아니라, 노쇠되어 가던 원형질체를 낮은 농도의 PA에 배양시켰더니 DNA 합성과 세포분열이 유도되었다는 보고 (Kaur-Sawhney *et al.*, 1985) 등은 PA가 식물체의 노쇠 과정을 억제하는 성장조절물질임을 시사한다.

이와같이 노쇠 과정의 억제제로서 PA의 역할에 대한 관심이 집중됨에도 불구하고 그 작용 메카니즘에 대한 뚜렷한 정보는 아직 미흡하다. 여기에 Cohen 등 (1979)과 Popovic 등 (1979)에 의하면, 엽록체의 미세구조 관찰시 PA에 의해 틸라코이드 막구조가 유지되었으며, 또한 틸라코이드 막의 폴리펩티드 조성이 노쇠 과정이 진행됨에 따라 변화됨을 억제했다는 결과들로서 틸라코이드 막에 존재하는 엽록소 함량의 손실이 PA에 의해 억제되는 효과는 막구조를 유지시키려는 작용에 의해 나타난 현상일 지 모른다는 사실을 제시하였다.

이와같은 보고들에 근거하여, 본 연구는 배추 잎 원형질편을 암처리 함으로써 노쇠 과정을 유도한 후 triamine 인 spermidine을 처리하여 노쇠 과정의 생리·생화학적인 현상에 관련된 지표들에 미치는 노쇠 억제제로서의 spermidine의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 처리용액의 농도 결정. 본 실험에 사용된 재료는 재배용 품종인 서울배추로 2주일 키운 배추 제1엽을 직경 4.5cm 되는 cork borer로 잎원형절편을 만들어 1 mM Na, K-phosphate 완충용액 (pH 5.8)과 10^{-4} M spermidine이 포함되어 있는 5 ml의 배지에 잎의 뒷면이 위로 향하도록 띄운 후 동일 조건의 배양기 내에서 행하였다. 위의 원형절편 준비조각은 멸균상태에서 행하였다. Spermidine 처리용액의 농도는 엽록소 함량의 감소로서 나타나는 노쇠 현상을 가장 효과적으로 저지시키는 농도인 10^{-4} M을 최적 농도로 사용하였다 (Table 1). Benzyladenine

(BA)의 농도는 Park (1983)의 결과에 의하여 10^{-6} M을 최적농도로 사용하였으며, 대조구로서는 1 mM Na, K-phosphate완충용액 (pH 5.8)만을 처리하였다.

Table 1. Effects of spermidine concentrations on chlorophyll content in the leaf discs* of Chinese cabbage

Spermidine Concentrations (M)	Chlorophyll** Content ($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	Chlorophyll Loss*** (%)
0	1.42	62
10^{-5}	1.22	67
10^{-4}	3.43	8
10^{-3}	3.32	10
10^{-2}	3.25	12

Each value was a mean of three replicates.

*Leaf discs were excised from the first leaves of 2 week old seedlings (time 0) and floated on spermidine solution.

**Chlorophyll content was measured after dark incubation over 5 days.

***The values were relative rate of time 0 ($3.7 \mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$).

엽록소, 단백질, malondialdehyde함량 측정. 엽록소 함량의 측정은 Holden (1965)의 방법에 따랐으며 단백질 함량은 Bradford (1976)의 방법에 따라 측정하였다. Malondialdehyde (MDA)함량은 생물체에서 지질의 과산화 정도를 간접적으로 측정하는 TBA test로 측정하였다 (Dhindsa, 1981).

효소용액의 제조 및 활성도 측정. 효소용액의 제조는 20개의 잎원형절편을 0.3 g의 석영사와 2 ml의 70 mM K-phosphate완충용액 (pH 8.0)으로 마쇄한 후 $20,000\times$ g에서 20분간 원심분리하였다. 상정액을 효소용액으로 사용하였으며, 모든 조작은 $0-4^{\circ}\text{C}$ 에서 행하였다. Catalase와 peroxidase의 활성도 측정은 Chance와 Machly (1955)의 방법을 따랐다.

에틸렌 생성의 측정. 25 ml의 용기에 1 mM Na, K-phosphate완충용액 (pH 5.8)과 5×10^{-6} M IAA 또는 10^{-4} M spermidine등이 포함되어 있는 5 ml의 배지에 20개의 잎원형절편을 띄우고 실리콘 마개를 한 후 25°C 의 암소에서 배양하였다. 1일 또는 2일이 경과한 후 용기내의 기체를 1 ml 채취하여 기체 크로마토그래피로 분석함으로써 일정조건하에서 조직이 생성한 에틸렌의 양을 측정하였다 (Yu and Yang, 1979).

결과 및 고찰

노쇠과정의 생리현상에 미치는 spermidine의 효과. 잎의 노쇠과정에 있어서 외관상 뚜렷한 변화 중의 하나는 광합성 색소의 분해결과로 인한 잎의 황화현상이다. Fig. 1은 페어넌 배추잎 원형절편을 5일간 암처리 하였을 때 엽록소 함량이 소실되는 정도와 그때 spermidine의 효과를 나타낸 것이다. 이때 상대적인 비교를 위하여 일반적으로 식물세포의 노쇠억제제로 알려진 호르몬인 benzyladcnine의 효과도 아울러 조사하였다.

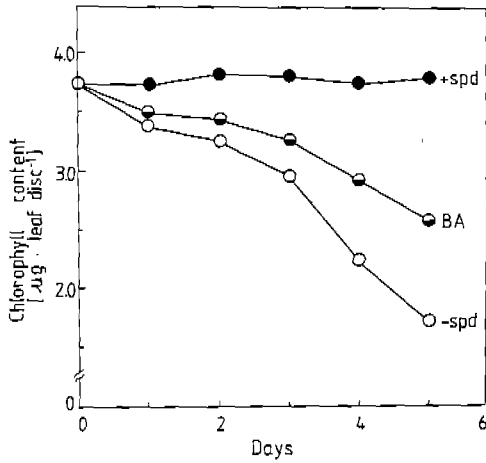


Fig. 1. Effects of spermidine (spd) and benzyladenine (BA) on chlorophyll content in the first leaf discs of Chinese cabbage during senescence.

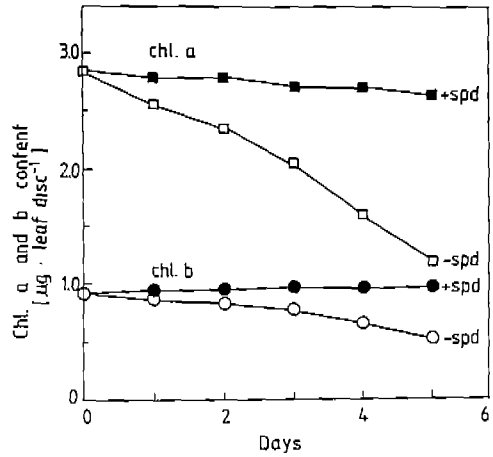


Fig. 2. Effect of spermidine on chlorophyll a and b content in the first leaf discs of Chinese cabbage during senescence.

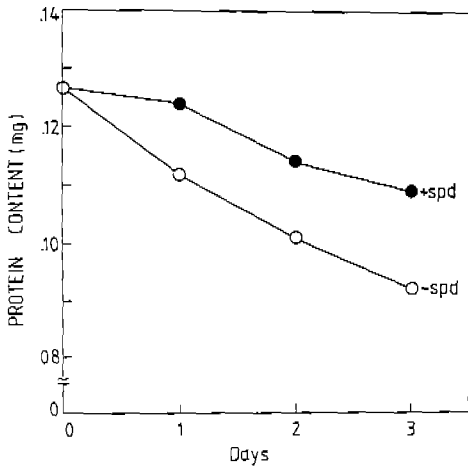


Fig. 3. Effect of spermidine on protein content in the 40 leaf discs of Chinese cabbage during senescence.

대조구에서는 5일째까지 엽록소 함량의 소실정도에서 보여주듯이 상당한 노쇠현상을 보여 주었다. BA와 spermidine처리구에서는 풀다 대조구에 비해 엽록소 함량의 손실이 매우 저지 되었으나 그 효과는 spermidine이 훨씬 커서 5일간 노쇠과정동안 엽록소 함량의 손실이 거의 없었다. 이 결과는 Cohen 등 (1979)이 보리잎을 재료로 연구한 결과와 일치하며 spermidine이 매우 강력한 노쇠억제제임을 보여주는 것이다. 이때 엽록소 a와 엽록소 b의 분해 속도의 양상은 Fig. 2와 같다. 노쇠과정중 엽록소 a는 엽록소 b보다 분해속도가 빠르므로 노쇠과정이 진행됨에 따라 엽록소 a/b율이 3정도 수준에서 2정도로 감소되었다. 이는 엽록소 a가 엽록소 b보다 파괴되기 쉬운 느슨한 틸라코이드 막에 더 많이 위치하기 때문인 것으로 해석되며, Maunders

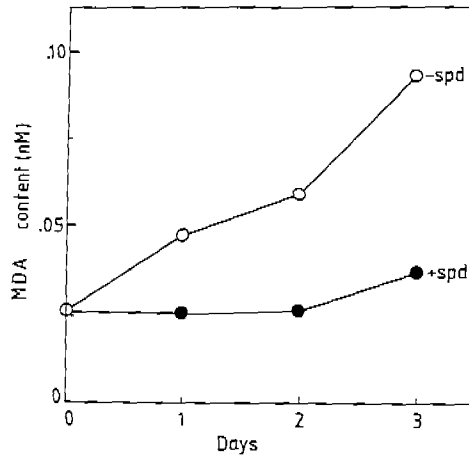


Fig. 4. Effect of spermidine on MDA content in the 40 leaf discs of Chinese cabbage during senescence.

와 Brown (1983)은 노쇠된 잎에서 엽록소 a/b율이 1까지 감소된다고 보고한 바 있다. Spermidine처리구에서는 엽록소 a와 b의 분해가 모두 저지되었다.

노쇠의 또다른 생리적 지표인 수용성 단백질 함량의 변화양상과 그때 spermidine의 효과를 조사하였다. 노쇠과정은 단백질을 포함한 고분자물질의 분해소실 과정이다 (Thomas and Stoddart, 1980). 본 연구의 결과에서도 Fig. 3에서와 같이 3일간의 노쇠과정에 이르는 동안 30%정도의 단백질 함량이 소실됨을 보였으나 spermidine을 처리한 조건에서는 어느 정도 감소현상을 저지시켜 22%의 소실만을 보였다. 이는 spermidine에 의하여 세포내의 생리적인 활성이 높게 유지되었음을 보여주는 것이다.

엽록소 분해에 대한 메카니즘은 아직 밝혀지지 않은 상태이나 엽록소는 전적으로 틸라코이드막에 위치하므로 spermidine에 의한 엽록소 함량의 지연 억제현상은 세포막구조 수준에서 연구할 수 있다. 본 연구에서는 세포의 노쇠에 따라 나타나는 세포막구조의 손상에 미치는 spermidine의 효과를 조사하기 위하여 세포막을 구성하고 있는 불포화지방이 과산화될때 생성되는 중간산물인 MDA함량의 변화를 대조구와 비교 조사하였다.

Fig. 4에서와 같이 대조구에서는 노쇠과정의 초기부터 MDA함량의 급격한 증가를 이루어 세포막 구성성분이 크게 손상되었음을 보였는데 이는 세포막 기능의 불안정화가 노쇠현상을 시작하는 1차적 사건중의 하나라는 사실을 시사한다. 3일간의 노쇠과정에 있어 대조구에서는 MDA함량이 3배정도 증가되었으나 spermidine처리구에서는 거의 증가양상을 보이지 않아 세포막의 구성성분이 그대로 유지되었음을 알 수 있었는데, 최근에 Cohen 등 (1979)은 엽록체의 틸라코이드막 구조의 변화가 PA을 처리함에 의해 저지됨을 미세구조 관찰로 보여주었으며, betacyanin 방출로서 인식되는 세포막의 투과성이 노쇠과정동안 증가되는데 (Altman, 1982) PA을 처리시 이 물질의 방출이 억제된 결과에서 Altman (1982)은 PA에 의한 세포막구조의 유지를 보고한 바 있다.

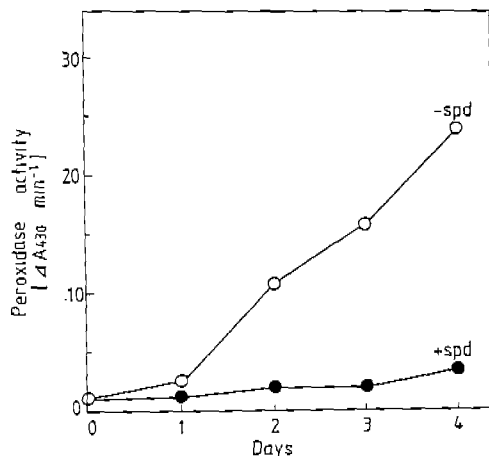


Fig. 5. Effect of spermidine on peroxidase activity in the 20 leaf discs of Chinese cabbage during senescence.

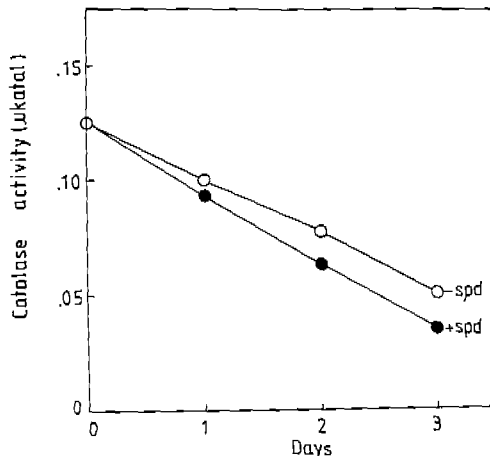


Fig. 6. Effect of spermidine on catalase activity in the 20 leaf discs of Chinese cabbage during senescence.

효소활성도에 미치는 spermidine의 효과. 노쇠과정의 시작은 생체내에 축적되는 H_2O_2 와 관련이 있으며, 이를 이용하는 peroxidase활성도의 증가와 더불어 분해하는 catalase활성도의 감소에 의해 수반된다 (Brennan and Frenkel, 1977; Dhindsa, 1981). 따라서 생화학적 수준에서 노쇠과정과 관련된 peroxidase와 catalase의 활성도에 미치는 spermidine의 효과를 조사하였다.

세포내 H_2O_2 를 이용하여 유기물을 산화시킨다고 알려진 peroxidase활성도는 Kar와 Mishra (1976)의 보고에 의하면 노쇠될 수록 증가됨을 보이므로 생화학적 지표로 사용될 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 Fig. 5에서와 같이 있을 때 2일째부터 현저하게 증가되어 일치하는 경향을 보였으며, spermidine 처리구는 4일간의 전체 노쇠과정을 통하여 이 효소의 활성도가 낮게 유지되어 대조구와 많은 차이를 보였다. Spermidine에 의해 이 효소의 활성도 증가가 억제됨은 아직 보고되지 않은 PA의 효과중 하나로서 노쇠과정을 억제하는 작용메카니즘을 설명함에 있어 중요한 의미가 있다고 하겠다. 즉, spermidine에 의한 노쇠억제효과는 이 효소의 활성도를 조절하는 능력을 통하여 발현될 가능성을 시사하여 준다.

한편 Fig. 4와 Fig. 5의 두 결과에서 보듯이 MDA함량의 증가에 뒤이어 peroxidase활성도가 증가됨은 세포막의 손상으로 인하여 이 효소의 활성이 2차적으로 증가되었음을 의미한다. 손상 안된 세포막의 구성물질은 분해효소들에 대해 매우 안정하나 노쇠됨에 따라 세포막이 손상되면 그 구성성분들은 즉시 가수분해 효소들의 기질이 될 수 있으며 또한 액포막등의 손상으로 인하여 가수분해 효소들의 방출이 더욱 증가된다 (Thimann, 1980). 따라서 spermidine에 의한 효과는 세포막구조를 유지시킴으로써 이 효소의 방출을 막고 또 다른 한편으로는 이 효소의 활성도를 낮게 유지시킴으로써 세포막의 구성성분이 가수분해됨을 막아 세포막 구조가 보호되었을 것으로 생각된다.

생체내 독성물질로 세포의 노쇠를 촉진시킨다는 H_2O_2 를 분해하는 catalase 활성도 변화에 미치는 spermidine의 효과는 Fig. 6과 같다. 노쇠과정이 진행됨에 따라 catalase활성도는 spermi-

dine 처리구와 대조구 모두에서 감소되는 경향을 보임과 동시에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. Park (1983)에 의하면 BA를 처리시 노쇠과정중에 있는 유채자엽내 catalase활성도의 감소가 억제되는 것으로 보아 BA이 노쇠현상을 억제하는 메카니즘의 일부는 catalase 등 자유라디칼을 파괴하는 효소의 활성도를 높게 유지시킴으로써 발휘됨을 보였는데, 본 연구에서 spermidine은 이 효소의 활성을 유지시키는 효과를 나타내지 않았으므로 노쇠현상을 저지시키는 spermidine의 작용과 이 효소의 활성도와는 관련이 없는 것으로 생각된다. 다만 spermidine은 peroxidase활성도의 억제로 나타나는 노쇠지연 효과를 보여주는 것 같다.

Spermidine효과에 미치는 Ca^{2+} 이온의 영향. Spermidine에 의한 여러 생리적 및 생화학적 대사과정의 조절이 이 물질의 양이온적 성질로 인하여 발현되는가를 조사하기 위하여 무기 양이온인 Ca^{2+} 이온을 농도별 (1 mM, 10 mM)로 spermidine과 같이 처리하였을 때 노쇠과정의 뚜렷한 지표인 엽록소 함량의 변화에 대한 효과를 비교하여 보았다.

Table 2. Effects of spermidine and Ca^{2+} ion on chlorophyll content in the leaf discs* of Chinese cabbage

	Control	CaCl ₂		CaCl ₂ +spd		spd
		1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	
Chlorophyll Content** ($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	1.64	1.72	1.75	3.07	2.16	3.66

The value of time 0 was $3.7 \mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$.

* Leaf discs were excised from the first leaves of 2 week old seedlings (time 0) and floated on spermidine and CaCl₂ (1 mM, 10 mM) solutions.

** Chlorophyll content was measured after dark incubation over 5 days.

Table 2에서 보듯이 Ca^{2+} 이온 자체는 노쇠과정에 따른 엽록소 함량의 감소현상에 별 영향을 미치지 못하였으나 spermidine과 같이 처리하였을 때는 두 농도 (1 mM, 10 mM)에서 모두 엽록소 함량의 손실을 억제시키는 spermidine의 효과를 감소시켰으며, 1 mM보다 10 mM Ca^{2+} 이온 농도에서 더욱 크게 감소시켰다. 이 결과는 무기 양이온인 Ca^{2+} 이온이 spermidine대신 세포내 어떤 음이온 부위에 결합함으로써 spermidine활성의 발현을 방해하기 때문인 것으로 해석된다.

Altman (1982)은 PA의 효과가 amine기의 수에 비례하여 나타난다는 점을 들어 그의 양이온적 성질로 인하여 생물학적 활성이 나타나며 세포막의 인지질층의 음이온 부위에 결합함으로써 1차적으로 세포막을 안정화시키고 그에 따라 노쇠과정이 억제된다는 가설을 제시한 바 있다. 본 실험에서 Ca^{2+} 이온처리시 spermidine의 효과를 감소시킨 결과 (Table 2)와 spermidine에 의한 세포막 구조의 유지결과 (Fig. 4)는 위 가설을 뒷받침하는 증거로 제시될 수 있다.

에틸렌 생성에 미치는 spermidine의 효과. 에틸렌은 기체상의 식물 호르몬으로서 식물체에서 노쇠과정을 촉진시키는 이 생장조절물질의 여러 생리현상중 하나이며 또 에틸렌생성이 증가되면 노쇠되어가는 조직의 특징이다. 따라서 본 실험에서는 노쇠과정에 따른 에틸렌 생성증가와 아울러 IAA에 의해 유도되는 에틸렌생성에 대한 spermidine의 효과를 조사하였다.

Table 3. Effect of spermidine on ethylene production in 20 leaf discs* of Chinese cabbage incubated in the presence of spd and 4×10^{-6} M IAA during senescence

Detached Days	Senescence-Induced Ethylene Production (nl)		IAA-Induced Ethylene Production (nl)	
	-spd	+spd	-spd	+spd
1	172.8	96.9	1574.4	172.8
2	614.4	192.0	2649.9	195.8

* Leaf discs were excised from the first leaves of 2 week old seedlings (time 0).

The value of time 0 was 19.2 nl.

최근 Adams와 Yang (1979)에 의해 methionine이 에틸렌으로 전환되는 과정의 중간산물로서 S-adenosylmethionine (SAM)과 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)가 확인되었고 또한 Even-Chen 등 (1982)은 대사경로상 PA합성이 에틸렌의 선구물질인 SAM에서 파생되며 에틸렌의 생합성 과정에 관여함으로써 노쇠 과정을 조절할 지 모른다는 사실을 제시하였다. Table 3과 같이 노쇠 조직과 IAA에 의해 유도되는 에틸렌 생성증가가 spermidine에 의해 억제되는 본 실험 결과는 spermidine이 에틸렌의 생성을 억제 시킴으로써 에틸렌에 의해 유발되는 노쇠 과정을 조절할 것이라는 가능성을 제시해준다.

적 요

배추잎 원형질편을 암처리하였을 때 나타나는 생리·생화학적 노쇠현상에 대해 spermidine이 미치는 효과를 조사하였다. 5일간 암조건하의 배양시 대조구에서 엽록소 및 단백질함량의 소실에 의한 현저한 노쇠 현상을 볼 수 있었으나, 10^{-4} M의 spermidine 처리구에서는 엽록소 함량의 소실이 거의 없었으며 단백질 함량의 감소도 저지되는 것으로 보아 원형질편의 생리적 활성이 높게 유지 되었음을 보여주었다. 또한 spermidine은 노쇠 과정 초기 막지질 성분의 과산화로 인한 MDA함량의 증가를 억제하였으며, 노쇠 과정의 생화학적 지표인 peroxidase활성도의 증가를 거의 완전하게 억제하였으나 catalase활성도에 있어서는 대조구와 뚜렷한 차이를 보여주지 않았다. 위 결과들은 spermidine이 막구조를 유지시킨다는 사실을 제시하는 것이며, 또한 peroxidase의 활성도 조절능력을 통하여 노쇠 과정을 억제하는 것으로 사료된다. 또한, spermidine을 무기 양이온인 Ca^{2+} (1 mM, 10 mM)과 같이 처리하였을 때 엽록소 및 단백질 함량의 유지효과가 감소되었으며, 특히 10 mM Ca^{2+} 농도에서 더욱 감소된 점으로 보아 spermidine의 노쇠억제효과에 그의 양이온적 성질이 관련됨을 보이는 것으로 생각된다. 한편, spermidine은 잎의 노쇠에 따른 에틸렌 생성을 억제하였는데, 이는 spermidine이 에틸렌 생성에 관여함으로써 노쇠현상을 조절할 가능성을 제시하는 것이다.

참고문헌

Adams, D.O. and S.F. Yang. 1979. Identification of 1-amino-cyclopropan-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 170-174.

- Altman, A. 1982. Retardation of radish leaf senescence by polyamines. *Physiol. Plant.* **54**: 189-193.
- 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.
- Altman, A., R. Friedman, D. Amir and N. Levin. 1982. Polyamine effects and metabolism in plant under stress conditions. In, *Plant Growth Substances*. P.F. Wareing (ed.), Academic Press, New York. pp. 483-493.
- Benveniste, P. 1978. Membrane systems and their transformations in aging plant storage tissues. In, *Biochemistry of Wounded Plant Tissues*. G. Kahl (ed.), Walter de Gruyter & Co., Berlin. pp. 103-122.
- Borchert, R. 1978. Time course and spatial distribution of phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activity in wounded potato tuber tissues. *Plant Physiol.* **62**: 789-793.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- 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.
- Brennan, T. and C. Frennel. 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* **59**: 411-416.
- Chance, B. and A.C. Maehly. 1955. Assays of catalase and peroxidase. In, *Methods in Enzymology*. S.P. Colowick and S.P. Kaplan (eds.), Academic Press, New York. pp. 764-769.
- 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.
- Dhindsa, R.S., P.P. Dhindsa and T.A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* **32**: 93-101.
- Even-Chen, Z., A.K. Mattoo and R. Goren. 1982. Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxy-vinylglycine and by polyamines shunts label from 3,4-¹⁴C]methionine into spermidine in aged orange peel discs. *Plant Physiol.* **69**: 385-388.
- Frith, G.J.T. and M. J. Dalling. 1980. The role of peptide hydrolases in leaf senescence. In, *Senescence in Plants*. K.V. Thimann (ed.), CRC Press, Florida. pp. 117-130.
- Galston, A.W. 1983. Polyamines as modulator of plant development. *BioScience* **33**: 382-388.
- Galston, A.W. and R. Kaur-Sawhney. 1980. Polyamines and plant cells. What's new in plant physiology **11**: 1-8.
- Galston, A.W. and R. Kaur-Sawhney. 1982. Polyamines: Are they a growth substances? In, *Plant Growth Substances*. P.F. Wareing (ed.), Academic Press, New York. pp. 451-461.
- Galston, A.W., A. Altman and R. Kaur-Sawhney. 1978. Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat protoplasts. *Plant Sci. Lett.* **11**: 69-79.
- Holden, M. 1965. Chlorophylls. In, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. T.W. Goodwin (ed.), Academic Press, New York. pp. 462-488.
- Hurkman, W.J. 1979. Ultrastructural changes of chloroplasts in attached and detached, aging primary wheat leaves. *Amer. J. Bot.* **61**: 64-70.

- Kar, M. and D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenyloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* **57**: 315-319.
- Kar, P.K. and M.A. Choudhuri. 1986. Effects of light and spermine on senescence of *Hydrilla* and spinach leaves. *Plant Physiol.* **80**: 1030-1033.
- 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., L. Shih 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., N.S. Shekhawat and A.W. Galston. 1985. Polyamine levels as related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna aconitifolia* and *Avena sativa*. *Plant Growth Regulation* **3**: 329-337.
- Martin, C. and K.V. Thimann. 1972. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. 1. The formation of protease. *Plant Physiol.* **49**: 64-71.
- Maunder, M.J. and S.B. Brown. 1983. The effect of light on chlorophyll loss in senescencing leaves of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Planta* **158**: 309-311.
- Park, Y. S. 1983. The effects of allopurinol and phytohormones on senescence in the cotyledons of rape seedlings (*Brassica napus* L.). MS thesis, Seoul National University.
- Pitt, D. and M. Galpin. 1971. Increase in ribonuclease activity following mechanical damage to leaf and tuber tissues of *Solanum tuberosum* L. *Planta* **101**: 317-332.
- Pooviah, B.W. and A.C. Leopold. 1976. Effects of inorganic salts on tissue permeability. *Plant Physiol.* **58**: 182-185.
- Popovic, R.B., D.J. Kyle, A.S. Cohen and S. Zalik. 1979. Stabilization of thylakoid membranes by spermidine during stress-induced senescence of barley leaf discs. *Plant Physiol.* **64**: 721-726.
- Shevyakova, N.I., B.P. Stroganov and I.G. Kiryan. 1985. Metabolism of polyamines in NaCl-resistant cell lines from *Nicotiana glauca*. *Plant Growth Regulation* **3**: 365-369.
- Smith, T.A. 1985. The inhibition and activation of polyamine oxidase from oat seedlings. *Plant Growth Regulation* **3**: 269-275.
- Teitel, D.C., E. Cohen, S. (Malis) Arad, E. Birnbaum and Y. Mizrahi. 1985. The possible involvement of polyamines in the development of tomato fruits *in vitro*. *Plant Growth Regulation* **3**: 309-317.
- Thimann, K.V. 1980. The senescence of leaves. In, Senescence in Plants. K.V. Thimann (ed.), CRC Press, Florida. pp. 85-116.
- Thomas, M. and J.L. Stoddart. 1980. Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 83-111.
- Van Steveninck, R.F.M. 1975. The "washing" or "aging" phenomenon in plant tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**: 237-258.
- Villaneuva, V.R., R.C. Adlakha and A.M. Cantera-Soler. 1978. Changes in polyamine concentration during seed germination. *Phytochemistry* **17**: 1245-1249.
- Yang, S.F. and H.K. Pratt. 1978. The physiology of ethylene in wounded plant tissues. In, Biochemistry of Wounded Plant Tissues. G. Kahl (ed.), Walter de Gruyter & Co., Berlin. pp. 595-622.
- Yu, Y.B. and S.F. Yang. 1979. Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinyl glycine and cobalt ion. *Plant Physiol.* **64**: 1074-1077.