

당근 현탁배양세포에서 Ca^{2+} 과 Polyamine이 Callose 함량에 미치는 영향

表炳植·康榮燾*

(東新工科大学 食品營養學科·*延世大學校 生物學科)

Effects of Ca^{2+} and Polyamine on Callose Contents in Carrot Suspension Cultured Cells

Pyo, Byoung Sik and *Young Hee Kang

(Department of Food Sci. Nut., Dong Shin Engineering College, Naju and *Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

The effects of Ca^{2+} on polyamines on callose contents of carrot suspension cultured cells were studied. The regeneration process of the cell wall of carrot protoplast observed through the electron microscope.

Treatment of the carrot suspension cultured cells with Ca^{2+} and polyamines resulted in considerable increase on callose contents at 0.1 mM of Ca^{2+} and polyamines, particularly spermidine. Poly-L-lysine and poly-L-ornithine increased about 30% and 100% of callose contents than that of the control respectively, whereas verapamil and flunarizine markedly decreased the callose contents. These effects of Ca^{2+} and polyamines may be ascribed to a polycationic nature on the callose contents. Furthermore, Ca^{2+} and calmodulin increased the callose contents as Ca^{2+} of free ion rather than as Ca^{2+} -calmodulin complex. During the cultivation of the protoplast, the regeneration of the cell wall was somewhat observed on the 4th day, however, it was inhibited by verapamil. These results suggested that the promotive action of Ca^{2+} and polyamines were manifested in the callose contents and the regeneration of the cell wall.

서 론

세포벽 구성 성분중 하나인 callose는 원형질막에 존재하는 β -glucan synthetase II(GS II)에 의해 합성되어지는데 UDPGIucose를 기질로 하여 β -1,3-glucan를 세포벽내에 축적한다(Cercius and Soderhael, 1984; Girard and Fèvre, 1984; Hyashi *et al.*, 1987; Kato, 1981; Tighe and Heath, 1982). Polyamine과 Ca^{2+} 은 당근 뿌리와 현탁배양세포에서 추출한 GS II의 활성을 촉진시켰고, 원형질체 배양시 세포벽이 재생됨에 따라 효소의 활성이 증가됨을 보고하였다.(Cho *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1987; Pyo and Kang, 1988). 특히 세포질 내에서 생성되어 세포벽내

에 축적되는 callose는 세포벽 발달 과정의 특징이며, 세포나 조직의 회복 기작에 관여하기도 한다(Kauss and Jeblick, 1986). 또한 생리적 자극이나 세균 감염에 반응해서 생성되기도 하며, 원형질막 사이에 존재하는 papillae에도 축적된다(Dugges and Garcia, 1984). 불용성 탄수화물인 callose는 이밖에도 세포판과 화분관의 1차 세포벽에 생성 축적된다.

식물에 있어서 Ca^{2+} 은 식물 생장에 필수원소중의 하나로 식물체의 구조와 생리, 생화학적으로 중요한 역할을 하며(Hepler and Wayne, 1985; Rasmussen, 1970), 그 예로서 굴지성, 세포신장, 세포분열, 원형질 유동, 노화, 탈리 등에 관계한다(Lee *et al.*, 1983; Nance 1973; Poovaiah and Leopold, 1973; Veluthambi and Poovaiah, 1984).

최근 Ca^{2+} 은 second messenger 또는 signal substance로서 그 중요성이 입증되고 있으며(Veluthambi and Poovaiah, 1984), 'stimulus-response coupling' 효과를 일으켜 target enzyme를 조절하는 것으로 알려져 있다(Kauss, 1987). 그 대표적인 효소로서 protein kinase는 Ca^{2+} 에 의해 그 활성이 촉진되며, 이로 인하여 인산화를 일으켜 어느 특정한 효소의 활성에 영향을 미친다(Gregory *et al.*, 1988; Hetherington and Trewavas, 1984; Salimath and Marme, 1983).

Polyamine은 식물과 동물 및 미생물에서 널리 분포되어 있는데 식물에서는 생장과 발생 및 분화에 있어 생장조절물질로서 작용한다(Dumortier *et al.*, 1983). 이러한 polyamine은 다가가이온의 특성으로 단백질과 핵산의 합성(Basu and Marton, 1987; Hirasawa and Suzuki, 1985) 및 유사분열을 활성화하며(Palavan and Galston, 1982), 세포의 항상성 유지(Bagni and Mengoli, 1985)와 동정생식(Villanueva *et al.*, 1985) 그리고 파일의 성숙(Teitel *et al.*, 1985)등에도 관여한다. 또한 polyamine은 Mg^{2+} 와 Ca^{2+} 등과 같은 2가 양이온과 대치효과를 나타내며(Yan and Tao, 1982), 단백질 인산화에 관계하는 protein kinase의 활성을 증가시킨다(delta Fuente, 1984; Veluthambi and Poovaiah, 1984).

본 연구는 당근배양세포의 현탁배양시 polyamine과 Ca^{2+} 이 callose 함량 변화에 미치는 영향과 당근배양세포로부터 원형질체를 분리배양하여 전자현미경을 통한 세포벽 재생을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

현탁배양 당근(*Daucus carota* L.)뿌리로부터 유도한 callus를 B5(Gamborg *et al.*, 1968)현탁배양배지에서 현탁배양(120rpm/min.)하여 14일 마나 계대배양한 후 세포들의 분열과 생장이 가장 활발한 10일째된 세포들을 모아서 실험 재료로 사용하였다. 당근 현탁배양세포의 동조배양은 고체 배양배지에서 현탁 배양배지로 옮겨 6번 계대배양한 당근 현탁배양세포들을 phosphate 화합물 제거한 액체배양배지로 옮겨 3일간 배양한 후 KH_2PO_4 의 최종 농도가 0.2mM되게 만든 액체 배양배지에 24시간 배양하였다. 현탁 배양세포들을 phosphate 화합물을 제거한 배지로 세척한 후 phosphate 화합물을 제거한 배지에서 4일간 배양시킨 다음 정상 액체 배지로 옮겨서 배양하였다. 정상 액체배지로 옮긴 시점 부터 배양일로 삼았다(Amino *et al.*, 1983, 1985; Amino and Komamine, 1985).

Callose의 정량 Kohle등(1985)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 시행하였다. 당근 현탁배양세포를 여과지로 모아서 2% sucrose가 함유된 10 mM Mes/NaOH(pH 7.0) 완충액에 재현탁시킨 후 Whatman GF/C glass filter로 배양세포를 모았다. 모아진 세포들을 증류수로 세

척한 후 ethanol에 2분간 방치한 다음 진공 펌프를 이용하여 탈수시킨 세포들을 glass potter 마쇄기로 1 N NaOH에서 마쇄시킨 후 그 마쇄액을 15분간 80°C에서 반응시킨 다음 380xg에서 5분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 상정액에 0.1%(V/V) aniline blue를 첨가해 주었고 다시 1N HCl를 넣어 줌으로써 진한 푸른색으로 변화하였다. 산성으로 변했기 때문에 1M glycine/NaOH(pH 9.5) 완충액으로 pH를 조정하였으며, 이 반응액을 50°C에서 20분간 방치한 후 실온에서 30분 이상 지난 다음 형광량을 spectrofluorometer (excitation 400nm, emission 510nm)로 측정하였으며, 표준 시료로는 Laminarin(Tarkeuchi and Komamine, 1981)를 사용하였다.

원형질체 분리 및 배양 당근 뿌리로 부터 원형질체의 분리는 Asamizu와 Nishi(1980) 및 Asamizu 등(1977)의 방법을 수정하여 전 과정을 무균 상태에서 시행하였다. 세절된 당근 뿌리 1g당 10ml의 효소용액을 처리하였다. 효소용액으로는 2% cellulase Onozuka R-10, 1% macerozyme R-10, 그리고 0.7 M mannitol(pH 5.8)을 삼투 안정제로 사용하였다. 효소 용액은 원심분리하여 상정액을 milipore filter(0.45 μ m)로 여과한 후 4°C에서 하루 방치한 후 사용하였다. 세절된 당근 뿌리를 효소 용액과 27°C 암소에서 5시간 동안 30rpm으로 진탕배양한 후 stainless sieve(100 μ m)로 여과하여 세포 파쇄물을 제거한 다음 100xg에서 원심 분리하여 효소 용액을 제거하였다. 원형질체 원형질체를 0.5M mannitol이 함유된 basal salt 배지로 세척하고 100xg에서 원심분리하였으며, 이 과정을 3회 반복한 후 최종 원형질체의 용액이 1ml되게 만들었다. 이때 원형질체 밀도는 2×10^6 protoplasts/ml이었다. 원형질체 수율은 Kanai와 Edwards(1973)의 방법을 이용하여 0.5M mannitol Evans Blue 용액과 원형질체 현탁용액을 1:1(v/v)로 혼합하고 염색하여 생존성을 확인한 다음 hemocytometer로 측정하였다. 원형질체는 B5 액체배양배지에 0.1M sucrose, 0.5 M mannitol, 4.52 μ M 2,4-D를 첨가하여 27°C의 암소에서 배양하였다.

전자현미경 관찰 당근 배양세포로부터 분리한 원형질체를 날짜별로 배양한 다음 원심분리하여 원형질체를 모은 후 0.7M mannitol이 포함된 0.1M cacodylate 완충액으로 조정된 2.5% glutaraldehyde에 2시간 전 고정하고 0.1M cacodylate 완충액으로 2회 세척한 후 1.33% OsO₄, 0.1M cacodylate 완충액으로 후 고정하였다. 고정된 원형질체는 ethanol 농도 상승 순으로 50%에서 absolute ethanol까지 탈수한 후 propylene oxide로 치환하여 epoxy resin mixture에 포매하였다. 이와 같이 포매된 원형질체는 diamond칼을 사용하여 Reichert-YJung형 ultramicrotome으로 1 μ m 두께로 잘라 원형질체를 확인하고, 500-600Å의 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(Hitachi H-500형)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

당근 현탁배양근세포에 Ca²⁺과 calmodulin 및 chlorpromazine을 처리하여 배양했을 때 callose 함량 변화에 미치는 영향은 Ca²⁺의 처리 경우 0.1mM은 25% 정도, 0.01 mM과 1 mM에서는 10% 이상 callose 함량을 각각 증가시켰다. 한편, Ca²⁺이 free ion으로 작용하는지 또는 calmodulin과 복합체를 이루어서 영향을 미치는지를 알아보기 위해서 1 mM의 Ca²⁺과 calmodulin을 5, 10 unit씩 동시에 처리했을 때 callose 함량은 1 mM Ca²⁺만을 처리한 대조구와 유

사하였으며, calmodulin의 antagonist인 chlorpromazine(Raghothama *et al.*, 1985)을 처리했을 때 역시 함량에 변화가 없었지만 100 μM 에서 약간 감소하였다(Table 1). Ca^{2+} 에 의한 callose 함량의 증가는 전보(Lee *et al.*, 1987; Pyo and Kang, 1988)에서 보고한 바와같이 Ca^{2+} 이 GS II의 활성을 촉진한 결과로써 이 효소의 활성산물인 callose의 함량이 증가되었음과 일치하였다. 또한 Ca^{2+} 이 calmodulin과 복합체를 이루어 GS II의 활성에 작용하지 않고 free ion으로 영향을 미쳤기 때문에(Pyo and Kang, 1988) callose 함량변화에도 복합체로는 거의 영향을 미치지 않았으며, chlorpromazine도 100 μM 의 고농도에서는 약간의 함량 감소를 나타냈지만 큰 정도는 아니었고 10 μM 에서는 거의 변화가 없었다. 그런데 GS II에 의해 합성되는 callose는 세포벽 표면이 아니라 내부에 축적되며 (Tighe and Heath, 1982), 합성개시의 지연시간(lag time)이 30분 이내로 어느 물질의 처리 또는 세포의 상태를 변화 시켰을 때는 곧 바로 callose의 합성이 시작된다(Asamizu *et al.*, 1977). 지금까지 calmodulin은 고등식물중에서 완두, 녹두, 땅콩의 종자, 시금치의 잎, 옥수수 등에서 분리 추출되었으며, Ca^{2+} 과 calmodulin이 복합체를 이루어 NAD kinase, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, protein kinase, NAD reductase등에 작용하는 것으로 알려져 있는데(Cheung, 1983; Marme, 1986), 당근 현탁배양세포에서는 Ca^{2+} 이 free ion으로서 protein kinase와 같은 효소에 작용하여 GS II의 인산화 과정을 통한 covalent modification을 일으켜(Kato, 1982; Paliyath and Poovaiah, 1988; Kohle *et al.*, 1985; Wong *et al.*, 1986) 결국 GS II가 활성화되어 callose 함량이 증가한 것으로 사료된다.

한편 1 mM의 Ca^{2+} 의 함유되어 있는 당근 현탁배양 배지에 diltiazem과 flunarizine 및 EGTA를 처리해서 현탁배양 했을 때 10 μM flunarizine을 처리한 실험구는 Ca^{2+} 이 들어있는 정상 배지에서 배양시킨 대조구 보다 30% 정도, EGTA와 diltiazem은 10% 내지 20% 정도 감소시켰다(Table 2). Diltiazem과 flunarizine은 각각 Ca^{2+} 의 channel blocker와 세포내 Ca^{2+} 의 작용을 억제하는 물질(Marme, 1984; Saunderson and Hepler, 1982)로 callose 함량을 감소시켰는데 이는 Ca^{2+} 의 세포내로의 유입 및 세포내에서 Ca^{2+} 의 작용을 저해함으로써 GS II의 활성 억제에 따른 결과로 보이며(Pyo and Kang, 1988), Ca^{2+} 의 chelating agent인 EGTA도 이와 비슷한 경향을 나타냈다.

Polyamine을 0.01 mM, 0.1 mM을 각각 처리해서 현탁 배양 했을 때 putrescine과 spermidine은 모든 처리 농도에서 대조구 보다 30% 정도, spermine은 10%에서 20% 까지 callose의 함량을 증가시켰다. (Table 3). 또한 현탁배양세포에 배양세포 1g당 1mg의 poly-L-lysine은 대조구 보다 30% 정도, poly-L-ornithine은 100% 이상의 callose 함량을 증가하였다. 한편 ATP는 callose 함량을 약간 증가시켰으며, 1mM의 NaF를 처리했을 때는 대조구 보다 20% 정도, 10mM에서는 10% 정도 callose의 함량을 증가시켰다(Table 4). 이렇게 polyamine을 처리했을 때 callose의 함량이 증가한 것은 Ca^{2+} 처리구에서와 마찬가지로 polyamine이 다가 양이온적 특성으로 GS II의 활성을 촉진했던 사실(Kauss and Jeblick, 1986; Lee *et al.*, 1987; Pyo and Kang, 1988)로 부터 기인된 것이다. Ca^{2+} 과 polyamine이 다가 양이온적 특성으로 callose 함량의 변화에 영향을 미치는지를 알아 보기 위해 B5 기본배양 배지에 분자량이 25,000인 poly-L-lysine과 poly-L-ornithine을 처리했을 때 callose 함량이 증가는 다가양이온이 원형질막의 혼란을 유발시켜 세포 밖으로의 전해질의 유출을 일으키며 이로 인해 세포질내의 Ca^{2+} 농도를 증가시켜서 증가된 Ca^{2+} 이 GS II에 직접 작용하여 효소 활성을 촉진시킨다는 보고가 있다(Kauss and Jeblick, 1986). 또 다른 가능성은 poly-lysine과 poly-L-ornithine이 Ca^{2+} -dependent

Table 1. The effect of Ca²⁺ on callose contents in carrot suspension cultured cells. The cells were incubated at 27°C for 4hr in B5 medium. The assay was determined by spectrofluorometer(excitation 400 nm, emission 510 nm). Each value was the average of five separate examinations.

Treatment	Callose Contents(mg/gr. fr. wt.)
None	2.01
Ca ²⁺ 0.01 mM	2.28
0.10 mM	2.53
1.00 mM	2.27
Ca ²⁺ , 1 mM+Calmodulin, 5 unit	2.24
Ca ²⁺ , 1 mM+Calmodulin, 10 unit	2.34
Ca ²⁺ , 1 mM+Chlorpromazine, 10 μM	2.30
Ca ²⁺ , 1 mM+Chlorpromazine, 100 μM	2.07

Table 2. The effects of diltiazem, flunarizine and EGTA on callose contents in carrot suspension cultured cells. The cells were incubated at 27°C for 4hr in B5 medium. The assay was determined by spectrofluorometer(excitation 400 nm, emission 510 nm). Each value was the average of five separate examinations.

Treatment	Callose Contents(mg/gr. fr. wt.)
Control	2.27
Diltiazem, 0.1 mM	2.01
1.0 mM	1.79
Flunarizine, 10 μM	1.55
100 μM	1.90
EGTA, 10 μM	1.76
100 μM	1.19

* The control contained 1mM of CaCl₂.

Table 3. The effect of polyamines on callose contents in carrot suspension cultured cells. The cells were incubated at 27°C for 4hr in B5 medium. The assay was determined by spectrofluorometer (excitation 400 nm, emission 510 nm). Each value was the average of five separate examinations.

Polyamines added	Callose Contents(mg/gr. fr. wt.)
Control	2.27
Putrescine, 0.01 mM	2.88
0.10 mM	2.93
1.00 mM	2.99
Spermidine, 0.01 mM	2.86
0.10 mM	2.95
1.00 mM	2.99
Spermine, 0.01 mM	2.75
0.10 mM	2.86
1.00 mM	2.51

* The control contained 1mM of CaCl₂.

Table 4. The effects of poly-L-lysine, poly-L-ornithine, NaF and ATP on callose contents in carrot suspension cultured cells. The cells were incubated at 27°C for 4hr in B5 medium. The assay was determined by spectrofluorometer (excitation 400 nm, emission 510 nm). Each value was the average of five separate examinations.

Treatment	Callose Contents(mg/gr. fr. wt.)
Control	2.27
Poly-L-lysine(1mg/gr. fr. w.)	2.92
Poly-L-ornithine(1mg/gr. fr. wt.)	4.65
ATP, 0.5 mM	2.34
1.0 mM	2.29
NaF, 1 mM	2.78
10 mM	2.52

* The control contained 1mM CaCl₂.

protein kinase를 활성화 시킴으로써 (Polya and Micucci, 1985) 간접적으로 세포 활성화에 영향을 미쳐 결국 callose 함량의 증가를 일으키는 것으로 사료된다. 한편 ATP와 phosphatase 억제제인 NaF(Paliyath and Poovaiah, 1988) 역시 callose 합성을 촉진하였는데 이러한 결과는 ATP와 NaF가 인산화과정이 활발하게 일어나도록 해줌으로써(Budde and Chollet, 1987) GS II의 활성이 촉진되어(Lcc *et al.*, 1987; Pyo and Kang, 1988) 결국 callose의 함량이 증가된 것으로 사료된다.

당근 배양세포로부터 효소 처리를 하여 얻어진 원형질체에 삼투압을 인위적으로 부여해줌으로써 배양이 가능하며, 배양초기에서는 세포벽의 재생이 완만하다가 후기에 접어들면서 활발하게 이루어진다. 원형질체에서 그 차이는 크며 일반적으로 6일에서 15일이 소요된다(Galbraith, 1981). 그림 1과 2는 당근 배양세포로부터 분리한 원형질체를 2일 동안 배양시킨 후 관찰한 것으로 세포소기관이 뚜렷하게 보임으로 살아 있는 것으로 추정되었고 세포벽이 재생되기 시작함을 보였다. 한편 원형질체를 4일 동안 배양했을때 배양세포는 여전히 살아 있었고 세포벽이 확실하게 관찰되었으며(Fig. 3), 1 mM의 verapamil을 처리했을때는 어느 정도의 세포벽이 재생되었음을 볼 수 있었지만 정상 배지에서 배양된 원형질체와는 달리 재생된 세포벽이 완전하지 않았다(Fig. 4). 당근 원형질체 배양에서 세포벽의 형성이 4일째까지는 어느 정도 느슨하게 만들어지며 최소한 96시간이 지나야 세포 분열이 일어난다(Asamizu and Nishi, 1980; Asamizu *et al.*, 1977). 또한 4일 동안 배양한 원형질체 세포벽의 cellulose의 함량은 정상 세포의 1/10 수준이며, 이때 cellulose의 합성도 활발하게 일어난다(Takcuchi and Komamine, 1981). 이에 대한 증거로 대두의 원형질체 배양시 원형질체 내부에서 외부 쪽으로 1,3-linked glucan이 활발하게 이동한다(Griffing *et al.*, 1986). 따라서 그림 3에서 보여주듯이 4일 동안 배양한 원형질체에 세포벽의 재생은 어느 정도 이루어졌으며, 배양 초기에 세포벽 재생이 완만히 일어난다는 보고(Asamizu *et al.*, 1977)와 GS II의 활성이 2일째까지는 활성 촉진율이 비교적 완만하게 이루어지다가 3일째까지는 활성 촉진율이 비교적 완만하게 이루어지다가 3일째에 가장 높은 활성을 고려해 볼 때(Lee *et al.*, 1987) 세포벽의 관찰은 4일 동안 배양한 세포에서 가능한 것으로 사료된다. 그러나 verapamil이 Ca²⁺의 유입을 막음으로써 세포벽 재생을 억제한 결과(Fig. 4) 정상 배지에서 자란 배양세포와는 다르게 완전하지 못한 세포벽 상태를 보여 주었다. 따라서

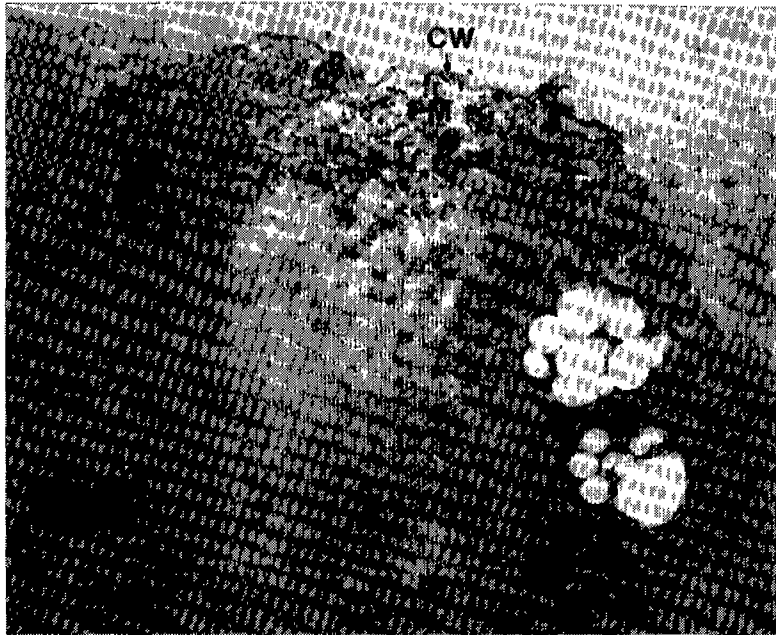


Fig. 1. Electron micrograph of a carrot protoplast which was cultured in B5 medium supplemented with 0.5 mM of mannitol for 2 days. $\times 7,500$. CW; cell wall PM; plasmalemma V; vacuole M; mitochondrion

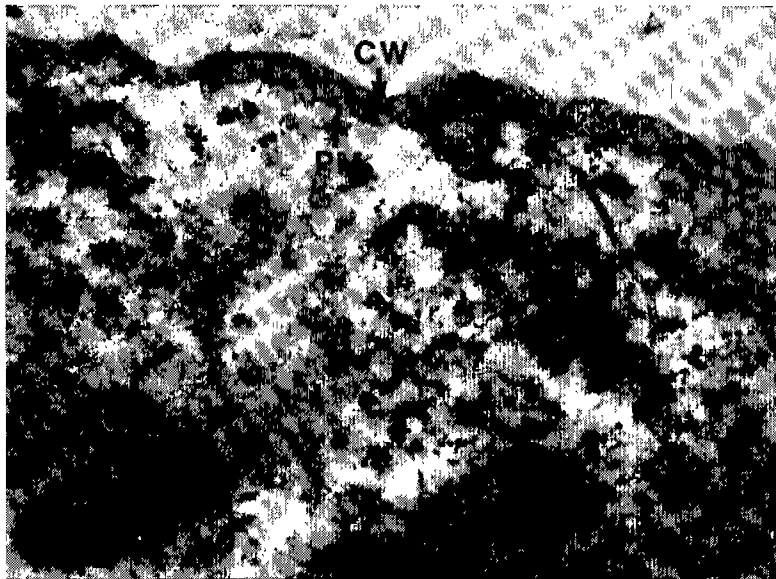


Fig. 2. Electron micrograph of a carrot protoplast which was cultured in B5 medium supplemented with 0.5 mM of mannitol for 2 days. It showed that cell wall was somewhat regenerated on the surface of plasmalemma. $\times 50,000$. CW; cell wall PM; plasmalemma

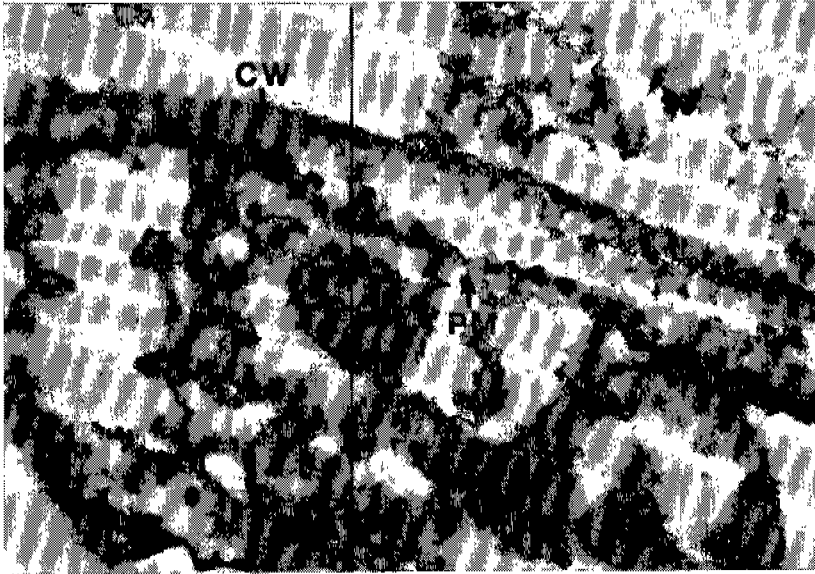


Fig. 3. Electron micrograph of a carrot protoplast which was cultured in B5 medium supplemented with 0.5 mM of mannitol for 4 days. It showed that cell wall was regenerated on the surface of plasmalemma. x50,000. CW; cell wall PM; plasmalemma

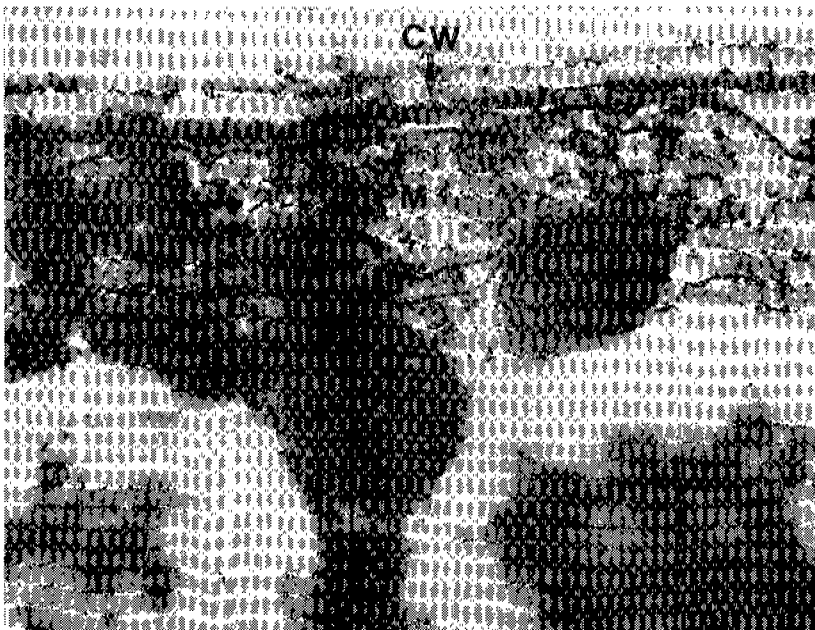


Fig. 4. Electron micrograph of a carrot protoplast which was treated with 1 mM of verapamil in B5 medium supplemented with 0.5 mM mannitol for 4 days. It showed that the regeneration of cell wall was inhibited by verapamil. The cell wall was not completely regenerated. x50,000. CW; cell wall PM; plasmalemma

원형질체에서의 세포벽 재생도 원형질막 세포벽 합성에 관여하는 효소인 Gs II가 원형질막에 주로 존재한다는 사실(Cerenius and Soderhael, 1984; Lutteneger and Nevins, 1985)을 고려해 볼 때 GS II의 활성이 그대로 보존되어 세포벽 재생이 가능한 것으로 사료된다.

적 요

당근 현탁 배양세포에서 Ca^{2+} 과 polyamine이 세포벽 구성 성분인 callose 함량에 미치는 영향과 원형질체 배양시 세포벽 재생 과정을 전자현미경으로 관찰하고자 하였다.

당근 현탁배양세포에 Ca^{2+} 과 polyamine을 처리하여 배양했을시 callose 의 함량은 0.1 mM Ca^{2+} 과 1 mM의 putrescine과 spermidine의 처리구에서 가장 높았다. 또한 poly-L-lysine과 poly-L-ornithine은 각각 30, 100% 정도의 callose 함량을 증가시켰고 verapamil과 flunarizine은 callose 함량을 현저하게 저하시켰는데 이는 Ca^{2+} 과 Polyamine이 다가 양이온적 특성으로 함량을 증가시키는 것으로 사료된다. 한편 Ca^{2+} 은 calmodulin과 복합체로서 작용하였다고 보다는 Ca^{2+} 이 free ion으로 증가시키는 것으로 나타났다. 원형질체 배양시 세포벽의 재생은 4일째에 어느정도 관찰되었고 verapamil에 의해서 세포벽 재생이 저해되었다. 이상의 결과로 보아 Ca^{2+} 과 polyamine은 세포벽 구성 성분인 callose 함량을 증가시킴으로써 세포벽 형성을 증진시킨다고 사료된다.

REFERENCES

- Amino, S., T. Fujimura and A. Komamine. 1983. Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* **59** : 393-396.
- Amino, S. and A. Komamine. 1985. Turnover of cell wall polysaccharides during the cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Physiol.* **26**(4) : 745-751.
- Amino, S., Y. Takeuchi and A. Komamine. 1984. Changes in cell wall constituents during the cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* **60** : 326-332.
- Amino, S., Y. Takeuchi and A. Komamine. 1985. Changes in intracellular UDP-sugar levels during cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* **64** : 197-201.
- Asamizu, T. and A. Nishi. 1980. Regenerated cell wall of carrot protoplasts isolated from suspension-cultured cells. *Physiol. Plant.* **48** : 207-212.
- Asamizu, T., K. Tanaka, I. Takano and A. Nishi. 1977. Changes in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall on carrot protoplast. *Physiol. Plant.* **40** : 215-218.
- Bagni, N. and M. Mengoli. 1985. Characterization of a carrot callus line resistant to high concentrations of putrescine. *Plant Growth Regulation.* **3** : 371-380.
- Budde, R. J. A. and R. Chollet. 1988. Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation. *Physiol. Plant.* **72** : 435-439.
- Cerenius, L. and K. Soderhael. 1984. Isolation and properties of β -glucan synthetase from the aquatic fungus, *Aphanomyces astaci*. *Physiol. Plant.* **60** : 247-252.
- Cheung, W. Y. 1983. Calcium and cell function. Academic Press, New York, pp. 264-311.
- Cho, Y. D., S. H. Lee, M. Y. Kim and H. M. Lee. 1985. Effect of polyamines on glucan synthetase activity. *Kor. J. Bot.* **28** : 243-251.
- delta Fuente, R. K. 1984. Calcium in the polar secretion of indolacetic acid. *Plant Physiol.* **76** : 342-346.

- Dugger, W. M. and S. B. Garcia. 1984. Structure, function and biosynthesis of plant cell walls. *Plant Biochemistry*. pp. 91-134.
- Dumortier, F. M., H. E. Flores, N. S. Shekhawat and A. W. Galston. 1983. Gradients of polyamines and their biosynthetic enzymes in coleoptiles and roots of corn. *Plant Physiol.* **72** : 915-918.
- Galbraith, D. W. 1981. Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using Calcofluor White. *Physiol. Plant.* **53** : 111-116.
- Gamborg, O.L., R.A.Miller and K.Ojima, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50** : 151-158.
- Girard, V. and M. Fevre. 1984. β -1-4- and β -1-3-glucan synthetases are associated with the plasma membrane of the fungus *Saprolegnia*. *Planta.* **160** : 400-406.
- Gregory, M. G., A. S. N. Reddy and B. W. Poovaiah. 1988. Effect of calcium on cell wall structure, protein phosphorylation and protein profile in senescing apples. *Plant Cell Physiol.* **29**(4) : 565-572.
- Griffing, L. R., B. G. Mersey and L. C. Fowke. 1986. Cell-fractionation analysis of glucan synthetase I and distribution and polysaccharide secretion in soybean protoplasts. *Planta.* **167** : 175-182.
- Hayashi, T., S. M. Read, J. Bussell, M. Thelen, F. C. Lin, R. M. Brown and D. P. Delmer. 1987. UDP-Glucose: (1-3)- β -glucan synthases from mung bean and cotton. *Plant Physiol.* **83** : 1054-1062.
- Hepler, P. K. and R. O. Wayne. 1985. Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36** : 397-439.
- Hetherington, A. M. and A. Trewavas. 1984. Activation of a pea membrane protein kinase by calcium ions. *Planta.* **161** : 409-417.
- Hirasawa, E. and Y. Suzuki. 1985. Occurrence of spermine in chromatin of zea may. *Plant Growth Regulation.* **3** : 239-245.
- Kanai, R. and G. E. Edwards. 1973. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C3, C4 and CAM plants using an aqueous dextran poly ethylene glycol two phase system. *Plant Physiol.* **52** : 484-490.
- 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.
- Kauss, H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38** : 47-72.
- Kauss, M. and W. Jeblick. 1986. Synergistic activation of, 3- β -D-glucan synthase by Ca^{2+} ion and polyamines. *Plant Science.* **43** : 103-107.
- Kauss, H. and W. Jeblick. 1986. Influence of free fatty acids, lysophosphatidylcholine, platelet-activating factor, acylcarnitine, and echinocandin B on 1,3- β D-glucan synthase and callose synthesis. *Plant Physiol.* **80** : 7-13.
- Kohle, H., W. Jeblick, F. Poter, W. Blashek and H. Kauss. 1985. Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+} -dependent process. *Plant Physiol.* **80** : 7-13.
- Lec, 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.
- Lee, S.H., Y.H.Kang, B.S.Pyo, Y.D.Cho, M.W.Kim and J.S.Lee. 1987. Effect of Ca^{2+} and polyamine of β -glucan synthetase activity in carrot root protoplast. *Kor. J. Bot.* **30**(3) : 173-179.
- Luttenegeger, G., and D. J. Mevins. 1985. Transient nature of a (1-3), (1-4)- β -glucan in *Zea mays* coleoptile

- cell walls *Plant Physiol.* **77** : 175-178.
- Marme, D. 1984. The role of calcium in the regulation of cellular metabolism. In current topics in plant biochemistry and physiology. Missouri-Columbia Univ. pp. 166-174.
- Nance, J. F. 1973. Effects of calcium and kinetin on growth and cell wall composition of pea epicotyls. *Plant Physiol.* **51** : 312-317.
- Palavan, N. and A. W. Galston. 1982. Polyamine biosynthesis and titer during various developmental stages of *Phaseolous vulgaris*. *Physiol. Plant.* **55** : 438-444.
- 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**(1) : 67-73.
- Polya, B. M. and V. Micucci. 1985. Interaction of wheat germ Ca²⁺-dependent protein kinases with calmodulin antagonists and polyamines. *Plant Physiol.* **79** : 986-972.
- Poovaiah, B. W. and A. C. Leopold. 1973. Inhibition of abscission by calcium. *Plant Physiol.* **51** : 848-851.
- Pyo, B.S. and Y.H.Kang, 1988. Effect of Ca²⁺ and polyamines on the activity of β -glucan synthetase II related to cell wall synthesis in carrot suspension cultured cells. *Kor. J. Bot.* **31**(2) : 83-91.
- Raghothama, K. G., Y. Mizrahi and B. W. Poovaiah. 1985. Effect of calmodulin antagonists on auxin-induced elongation. *Plant Physiol.* **79** : 28-33.
- Rasmussen, H. 1983. Pathway of amplitude and sensitivity modulation in the calcium messenger system. In Calcium and cell function. Academic Press New York. **4** : 1-61.
- Rasmussen, H. 1970. Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine mono-phosphate. *Science.* **170** : 404-412.
- Salimathh, B. P. and D. Marme. 1983. Protein phosphorylation and its regulation by calcium and calmodulin in membrane fractions from *Zucchini* hypocotyls. *Planta.* **158** : 560-568.
- Saunders, M. J. and P. K. Hepler. 1982. Calcium ionophore A23187 stimulates cytokinin like mitosis in *Funaria*. *Science.* **217** : 943-945.
- Takeuchi, Y. and A. Komamine. 1981. Glucans in the cell walls regenerated from *Vinca rosea* protoplasts. *Plant Cell Physiol.* **22**(8) : 1585-1594.
- Teitel, D. C., E. Cohen, S. Arad, E. Bironbaum and Y. Mizrahi. 1985. The possible involvement of polyamines in the development of tomato fruits in vitro. *Plant Growth Regulation.* **3** : 309-317.
- Tighe, D. M. and M. C. Heath. 1982. Callose induction in cowpea by uridine diphosphate glucose and calcium phosphate-boric acid treatments. *Plant Physiol.* **70** : 218-225.
- Veluthambi, K. and B. W. Poovaiah. 1984. Calcium and calmodulin regulated phosphorylation of soluble and membrane proteins from corn coleoptiles. *Plant Physiol.* **76** : 359-365.
- Veluthambi, K. and B. W. Poovaiah. 1984. Polyamine-stimulated phosphorylation of proteins from corn (*Zea mays* L.) coleoptiles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **122**(3) : 1374-1380.
- Veluthambi, K. and B. W. Poovaiah. 1984. Calcium promoted protein phosphorylation in plants. *Science.* **233** : 169-174.
- Villanueva, V. R., V. Mathivet and R. S. Sangwan. 1985. RNA, proteins and andro- genetic development of pollen in *Nicotiana tabacum* and *Datura innoxia*. *Plant Growth Regulation.* **3** : 293-307.
- Wong, Y. S., G.H. C. Cheng, D. A. Walsh and J. C. Lagarias. 1986. Phosphorylation of *Avena* phytochrome in vitro as a probe of light-induced conformational changes. *J. Bio. Chem.* **261**(26) : 12089-12097.

Yan, T. F. J. and M. Tao. 1982. Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. *J. Bio. Chem.* **257** : 7037-7043.

(1989. 7. 14 接受)