

Polyamine과 Polyamine의 생합성에 관련된 효소들의 시금치잎 세포내 분포에 관한 연구

金成鎬 · *金明苑 · 康榮熹

(延世大學校 理科學科 生物學科 · *文理科大學 生物學科)

Studies on the Intracellular Localization of Polyamines and Their related Enzymes in Spinach Leaves

Kim, Sung Ho, Myeong Won Kim*, Young Hee Kang

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul, *Department of Biology, Yonsei University, Wonju)

ABSTRACT

The intracellular localizations of polyamines and their related enzymes were investigated from young spinach leaves. Polyamines were present in all parts of plant cells, both in the subcellular organelles and in the soluble fraction of cytoplasm, however, polyamines were mainly located in the cytosolic fraction. Most activities of L-arginine decarboxylase(ADC) and L-ornithine decarboxylase(ODC), two important enzymes of putrescine and polyamine biosynthesis, were detected in cytosol fraction, while in subcellular organelles the activities were very low. Activities of diamine oxidase(DAO) and polyamine oxidase(PAO), the catabolic enzymes of diamine and polyamine, were not detected in spinach leaves. It was suggested that polyamines and their related synthetic enzymes were located in the soluble fraction of cytoplasm.

서 론

Polyamine은 식물, 동물 및 미생물에 모두 존재하는 생장조절물질로서 생리적 pH에서 양이온으로 작용하여 음전하를 띤 핵산과 강하게 결합하여 핵산을 안정화시켜주고 핵산의 합성을 촉진시킴으로써 성장에 관여한다(Altman *et al.*, 1982; Bagni *et al.*, 1982). 또한 polyamine은 DNase, RNase 등의 핵산분해효소와 단백질 분해효소의 활성을 억제하고 합성자체를 억제하기도 한다(Galston *et al.*, 1978; Galston and Kaur-Sawhney, 1980).

이외에도 polyamine은 생체막의 구성성분중 인지질의 음이온group과 결합하여 막구조를 안정화시키며 (Altman, 1980; 1982 a, b; Naik *et al.*, 1980)노화를 지연시켜 준다(Smith, 1982, 1985). 특히 polyamine은 식물의 분화와 발생에 관계하여 세포분열촉진 (Cohen, 1984; Torrigiani *et al.*, 1987), 발근촉진(Jarvis *et al.*, 1985), 화분관 성장촉진(Bagni *et al.*, 1981; Prakash

et al., 1988), 배발생 유도(Montague *et al.*, 1978; Feirer *et al.*, 1984) 등의 다양한 기능을 나타낸다.

Polyamine생합성의 key enzyme은 arginine decarboxylase(ADC)와 ornithine decarboxylase(ODC)로 알려져 있으며(Altman, 1982; Cohen, 1982) diamine oxidase(DAO)와 polyamine oxidase(PAO)에 의하여 분해되어 pyrroline을 형성하는 것으로 알려져 있다(Smith, 1985).

이상과 같이 polyamine의 다양한 생리적 기능에 대해서는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나, 이렇게 다양한 기능을 나타내는 polyamine의 세포내 분포에 대한 연구는 극히 미비한 실정이다(Bagni and Fracassini, 1974). 따라서 본 연구에서는 시금치잎을 재료로 polyamine의 세포내 분포와 polyamine의 합성효소인 ADC와 ODC 그리고 분해효소인 DAO와 PAO의 세포소기관별 활성도를 조사함으로써 polyamine이 나타내는 생리적 기능의 이해에 도움이 되겠다 하였다.

재료 및 방법

실험재료 본 실험에서 사용한 시금치(*Spinacia oleracea*)는 시중에서 구입한 것으로 길이 4cm 정도의 신선한 잎만을 사용하였다.

엽록체의 분리 시금치잎으로부터 엽록체의 분리는 Tewari(1979)의 방법을 이용하여 분리하였다. 시금치잎 100 g에 400ml의 2mM EDTA, 1mM mercaptoethanol, 0.1% BSA, 0.1M mannitol을 포함한 50mM Tris완충용액(pH 7.8)을 혼합하여 homogenizer(Nisei AM-8)로 15,000rpm에서 10초간 균질화시킨후 6겹의 거즈로 여과시켜 200xg에서 5분간 원심분리한 상정액을 다시 800xg에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 crude 엽록체로 사용하였다. 이 방법으로 분리한 엽록체에서는 17.5 $\mu\text{g/g} \cdot \text{fr} \cdot \text{wt}$ 의 chlorophyll이 정량되었는데 이는 entire cell에 존재하는 chlorophyll의 68%에 해당하였다.

핵의 분리 핵은 Chen등(1975)의 방법을 기초로 하여 분리하였다. 시금치잎 150 g을 300ml의 완충용액 A(25mM Mes-NaOH pH 6, 20mM KCl, 20mM MgCl₂, 0.6M sucrose, 40% glycerol, 1% monothioglycerol, 10mM Mercaptoethanol, 0.02% Triton X-100)에 현탁하여 2,500xg에서 20분간 원심분리한 침전물을 crude 핵으로 사용하였다. 이 방법으로 분리한 핵에서는 0.27mg/g. fr. wt의 DNA가 검출되었는데 이는 entire cell에 존재하는 DNA의 87%에 해당하였다.

Mitochondria의 분리 Mitochondria는 Douce등(1977)의 방법을 이용하였다. 100 g의 시금치잎에 400ml의 0.1M mannitol, 4mM cysteine, 1mM EDTA, 0.2% BSA, 0.6% PVP가 포함된 0.1M MOPS완충용액(pH 7.5)을 혼합하여 homogenizer(Nissci AM-8)로 15,000rpm에서 10초간 균질화시킨후 6겹의 거즈로 여과시켜 3,000xg에서 5분간 원심분리한 상정액을 12,000xg에서 20분간 원심분리하였다. 침전물을 다시 한번 같은 완충용액에 현탁하여 1,500xg에서 10분간 원심분리한 상정액을 11,000xg에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 crude mitochondria로 사용하였다. 이 방법으로 분리한 mitochondria에서는 4unit/g.fr.wt의 succinate dehydrogenase 활성도가 나타났으며 이는 entire cell에서 나타나는 효소활성도의 53%에 해당하였다.

Cytosolic fraction의 제조 Cytosolic fraction의 제조는 Bagni등(1974)의 방법을 일부 변형하여 시행하였다. 시금치잎 1g을 2mM EDTA, 1mM mercaptoethanol, 0.1% BSA, 0.1M mannitol이 포함된 50mM Tris-HCl완충용액(pH 7.8) 5ml과 섞어 glass homogenizer로 마쇄한 후 10,000xg에서 20분간 원심분리한 상정액을 다시 100,000xg에서 90분간 초원심분리한 상정액을 얻어 cytosolic fraction으로 사용하였다. 이 방법으로 분리한 cytosolic fraction에서는 DNA와 chlorophyll은 검출되지 않았고 RNA는 0.21mg/g.fr.wt.가 나타났으며 succinate dehydrogenase의 활성도는 나타나지 않았다.

Polyamine의 추출 및 정량 Thin layer chromatography에 의한 polyamine의 검출 및 정량은 Gorcn등(1982)의 방법을 변형하여 사용하였다. 시료에 5% perchloric acid를 가하여 막자사발을 이용하여 4°C에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 12,000xg로 20분간 원심분리하여 그 상정액을 시료원으로 사용하였다. 정량은 시료원 100 μ l에 dansyl chloride(5mg/ml in acetone) 200 μ l와 파괴화된 Na_2CO_3 100 μ l를 첨가한후 잘 섞어 12시간이상 상온에서 암처리하여 실시하였다. 처리된 시료에 50 μ l proline(100mg/ml)을 첨가하여 30분간 암실에서 방치한후 벤젠으로 dansyl유도체를 추출하여 이중 100 μ l를 TLC plate에 점적하였다. 전개용매 조성은 Chloroform:Triethylamine(25:2, v/v)으로 하였으며 자외선으로 표준시료와 비교하여 끊어내어서 ethylacetate 4ml로 용출시켜 electron photofluorometer($\lambda_{EX}=360$, $\lambda_{EM}=500$)에서 형광강도를 측정하였다.

Diamine oxidase, polyamine oxidase의 추출 및 활성도 측정 Diamine oxidase와 polyamine oxidase의 추출은 Kaur-Sawhney등(1981)의 방법을 변형하여 사용하였다. 0.1M K-phosphate완충용액(pH6.5)에 섞어 막자사발을 이용하여 시료를 마쇄하였다. 마쇄용액을 12,000xg에서 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 효소원으로 사용하였다. 효소의 활성도는 Smith등(1975)의 방법을 변형하여 측정하였으며, diamine인 putrescine과 polyamine인 spermidine, spermine을 기질로 하여 효소에 의해서 방출된 H_2O_2 가 peroxidase에 의해서 환원하면서 guaiacol이 tetraguaiacol로 산화되는 정도를 415nm에서 흡광도의 증가로 측정하였다. 효소반응액은 0.1M K-phosphate완충용액(pH6.5)과 25mM guaiacol및 10배 희석한 peroxidase(19units/mg)와 효소액을 넣어 부피가 2.8ml되게 하여 35 \pm 2°C에서 1분간 전처리한 다음, 20mM의 diamine과 polyamine 0.2ml을 가하여 효소반응을 시작하였다. 효소활성도는 tetraguaiacol생성량을 415nm에서 흡광도의 증가를 측정한후 tetraguaiacol의 몰흡광계수인 26.6cm $^{-1}$ ·mM $^{-1}$ (Chance and Maehly, 1955)에 의하여 산출하였다.

Arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase의 추출 및 활성도 측정 Arginine decarboxylase와 ornithine decarboxylase의 추출 및 활성도 측정은 Altman등(1982)의 방법에 따라 시행하였다. 시료를 10mM phosphate buffer(pH 7.2)에 0.1mM DTT, 1mM pyridoxal-5'-phosphate, 20mM Na-EDTA등이 포함된 용액에 넣고 마쇄한 후 12,000xg에서 20분간 원심분리하여 그 상정액을 효소원으로 사용하였다. 효소반응은 phosphate buffer(pH 7.2) 300 μ l, L-[U- ^{14}C] ornithine hydrochloride(Amersham 0.125 μ Ci, 285mCi/mmmole), L-[U- ^{14}C] arginine monohydrochloride(Amersham 0.125 μ Ci, 324mCi/mmmole), 효소원 200 μ l를 12cm 3 의 center well이 있는 flask에 넣은후 silicon마개로 막아 37°C에 60분간 반응시켰다. 이때 발생하는 $^{14}\text{CO}_2$ 은 methylbenzethonium hydrochloride 100 μ l를 묻힌 Whatman No. 1 paper(1cm x 2cm)에 흡수시켰다. 60분간 반응시킨 다음 perchloric acid 5%용액으로 반응을 중지시켜서 water bath에 30분간 증탕

시킨후 whatman paper를 cocktail solution넣고 liquid scintilation counter(Packard Tricard-300)로 방사능을 측정하였다.

결과 및 고찰

세포내 polyamine의 분포 Bagni등(1974)은 *Pisum sativum*의 etiolated epicotyls의 경우 polyamine은 particulate fraction과 soluble fraction에 모두 존재하지만 주로 soluble fraction에 존재할 것이라고 추측한바 있으며, McCornick(1978)은 동물세포의 경우 spermine은 대부분이 핵에 존재하며 나머지는 ribosome에 부착되어 있을 것이라고 보고하였을 뿐 polyamine의 세포내 분포에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 액포가 발달되지 않은 시금치의 어린 잎으로부터 엽록체, mitochondria, 핵 그리고 cytosolic fraction을 분리하여 그 안에 존재하는 polyamine의 양을 측정하였다(Table 1). 시금치의 잎에는 spermidine이 전체 polyamine의 60%로 가장 많이 존재하였고 spermine 24%, putrescine 16%의 순으로 나타났다. 이는 Bagni와 Fraassini(1974)가 시금치를 재료로 polyamine의 양을 측정한 결과와 유사하다.

세포소기관별 polyamine의 분포양상에 대한 연구에서 먼저 엽록체, mitochondria, 핵의 crude fraction으로부터 polyamine의 양을 측정하여 대략적인 분포양상을 알아본후 순화된 분획으로부터 polyamine의 분포를 알아보려고 하였으나 이들의 crude fraction에서조차도 극히 적은 양의 polyamine이 존재하였기 때문에 엽록체, mitochondria, 핵의 경우 순화단계까지는 실험을 진행하지 않았다. 엽록체에는 전체 polyamine의 1.6% 정도가 존재하고 있었으며 spermidine이 70%로 가장 많았다. Mitochondria에는 전체 polyamine의 0.5%정도가 존재하였고 polyamine의 구성비는 spermidine 83%, spermine 17%이었고 putrescine은 검출되지 않았다. 핵에는 총 polyamine양의 0.3%가 존재하였고 mitochondria의 경우와 마찬가지로 putrescine은 존재하지 않았으며 spermidine과 spermine이 각각 95%, 5%를 차지하고 있었다. 엽록체, mitochondria 그리고 핵에 polyamine이 극히 적은 양으로 존재하는 반면 cytosolic fraction에서는 전체 polyamine의 82%가 존재하였으며 polyamine의 조성은 putrescine 15%, spermidine 59%, spermine 26%로 spermidine이 가장 많았다. 이상의 결과로 시금치잎의 경우 polyamine은 엽록체, mitochondria, 핵등의 세포소기관에도 극소량 존재하는 것으로 나타났으

Table 1. Polyamine contents in the entire cell and in the subcellular fractions from spinach leaves.

Fractions	PUT	SPD	SPM
	nmole/g. fr. wt.		
entire cell	4.25±0.124	15.55±0.10	6.40±0.117
chloroplast	0.05±0.011	0.30±0.018	0.08±0.02
mitochondria	trace ^a	0.10±0.007	0.02±0.014
nuclei	trace	0.07±0.005	0.003±0.001
cytosol	3.17±0.132	12.60±0.101	5.60±0.125

put: putrescine, spd: spermidine, spm: spermine

a: trace means the contents less than 10⁻¹ pmole/g. fr. wt.

The table shows the results of representative experiment that was repeated on two other occasions with similar results.

나 이들 fraction이 crude한 것이라는 점과 polyamine이 다가양이온의 특성을 가지고 세포소기관의 막구조에 쉽게 결합할 수 있으므로 cytosol에 존재하는 polyamine으로부터 contamination이 될수 있는 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 따라서 시금치잎에 존재하는 polyamine은 거의 대부분이 세포질의 soluble fraction에 분포하여 있는 것으로 사료된다.

DAO와 PAO의 활성도분포 세포내 polyamine중 diamine인 putrescine은 diamine oxidase(DAO)에 의해 aminoaldehyde로 분해되며 이로부터 pyrroline이 형성된다(Federico and Angelini, 1988; Galston, 1983). 한편, triamine인 spermidine과 spermine은 polyamine oxidase(PAO)에 의해 1,3-diaminopropane과 pyrroline으로 분해된다(Altman *et al.*, 1982; Birecka *et al.*, 1988). Polyamine oxidase는 벼과 식물의 잎에서 활성도가 높게 나타나며 (Smith, 1977; Federico and Angelini, 1988), 다른 많은 단자엽식물이나 쌍자엽식물에서는 활성이 나타나지 않는 (Galston and Kaur-Sawney, 1980) 세포벽에 존재하는 효소이다(Kaur-Sawney *et al.*, 1980). Diamine oxidase는 일반적으로 콩과식물에서 활성도가 높게 나타나며 (Galston and Kaur-Sawney, 1980) 세포내 분포에 대해서는 알려져 있지 않다. 지금까지의 diamine oxidase와 polyamine oxidase에 대한 연구들을 대부분이 세포분열, 발아, 분화 등의 생리현상중에 나타나는 효소활성도의 조직부위별 변화에 관한 것들이다(Federico *et al.*, 1985a; Kaur-Sawney, 1981; Lin, 1984; Smith, 1985). 따라서 본 연구에서는 시금치잎의 세포내 polyamine의 분포와 함께 diamine oxidase와 polyamine oxidase의 세포내 활성도 분포를 알아 보고자 하였다(Table 2). 그러나, 시금치의 어린 잎에서는 polyamine oxidase의 활성도는 나타나지 않았고 diamine oxidase의 활성도는 극히 낮게 나타났다.

세포소기관별 ADC와 ODC의 활성도분포 동물과 미생물의 경우 diamine인 putrescine은 대부분 ornithine decarboxylase(ODC)에 의해 L-ornithine으로부터 합성되며 (Bachrach, 1970; Pegg and McCann, 1982; Prouty, 1976) putrescine으로부터 triamine인 spermidine과 tetraamine인 spermine이 합성된다(Altman *et al.*, 1982; Cohen *et al.*, 1982; Smith, 1985). 한편, 식물에 있어서는 arginine decarboxylase(ADC)에 의해 putrescine이 합성된다는 것이 일반적인 견해이다 (Heimer, 1979; Torrigiani *et al.*, 1987). 그러나, 세포분열이 왕성하게 일어나는 식물조직에서는 주로 ornithine decarboxylase(ODC)에 의하여 putrescine이 합성된다고 알려져 있다(Cohen and Mizrahi, 1982; Kaur-Sawney *et al.*, 1982).

지금까지의 arginine decarboxylase와 ornithine decarboxylase에 대한 연구는 식물의 생리과정중에 일어나는 조직부위별 활성도의 변화가 대부분이며 (Cohen and Heimer, 1982; Feirer *et al.*, 1984; Slocum and Galston, 1985) 세포내 세포소기관별 활성도는 거의 알려져 있지 않으나 Kyriakidis(1982)는 보리를 재료로 ornithine decarboxylase는 핵과 DNA를 가지고 있는 세포소기관에 존재하며, arginine decarboxylase는 cytosol에 존재할 것이라고 시사한 바 있다.

Table 2. DAO and PAO activities of spinach leaves.

	DAO	PAO
	units/mg protein·min	
spinach leaves	0.001	ND ^a

Enzyme activity is expressed as units·mg protein⁻¹·min⁻¹. One unit of activity is the amount of enzyme which produces a ΔA_{415} of 0.1 in 1 min.

a: not detected

Table 3. ADC and ODC activities in the entire cell and in the subcellular fractions from spinach leaves.

Fractions	ADC		ODC	
	nmole ¹⁴ C ₂ /g. fr. wt. h			
entire cell	10.06 ± 0.013(100%)		4.39 ± 0.016(100%)	
chloroplast	0.27 ± 0.004(2.7%)		0.08 ± 0.002(1.8%)	
mitochondria	0.21 ± 0.003(2.1%)		0.13 ± 0.001(3.0%)	
nuclei	0.19 ± 0.003(1.9%)		0.10 ± 0.001(2.3%)	
cytosool	9.46 ± 0.024(94%)		4.04 ± 0.018(92%)	

The table shows the results of representative experiment that was repeated on two other occasions with similar results.

Table 4. Specific ADC and ODC activities in the entire cell and in the subcellular fractions from spinach leaves.

Fractions	ADC		ODC	
	nmoles ¹⁴ C ₂ /mg protein · h			
entire cell	12.50 ± 0.067(100%)		6.25 ± 0.042(100%)	
chloroplast	0.30 ± 0.008(2.4%)		0.14 ± 0.003(2.2%)	
mitochondria	0.34 ± 0.012(2.7%)		0.18 ± 0.004(2.9%)	
nuclei	0.31 ± 0.014(2.5%)		0.16 ± 0.007(2.6%)	
cytosol	18.92 ± 0.097(151.3%)		9.54 ± 0.054(152.6%)	

The table shows the results of representative experiment that was repeated on two other occasions with similar results.

본 연구에서는 어린 시금치잎을 재료로 각 세포소기관별 polyamine의 분포(Table 1)와 함께 arginine decarboxylase와 ornithine decarboxylase의 세포소기관별 효소활성도를 알아보았다(Table 3). 시금치의 잎에서는 arginine decarboxylase의 활성도가 ornithine decarboxylase의 활성도보다 약 2배 높게 나타났다. 이로써 시금치 잎에서의 polyamine의 합성은 주로 arginine decarboxylase의 경로를 통해 일어난다는 것을 알 수 있다. 세포소기관별로 효소활성도를 살펴보면 arginine decarboxylase의 경우 엽록체, mitochondria, 핵에서 각각 entire cell에서 나타나는 효소활성도의 2.7%, 2.1%, 1.9%의 활성도가 나타났으며 cytosol에서는 94%의 효소활성도가 나타났다. ornithine decarboxylase의 경우도 arginine decarboxylase와 유사한 양상으로서 엽록체, mitochondria, 핵에서 각각 전체 효소활성도의 1.8%, 3.0%, 2.3%로 낮게 나타났으며 cytosol에서는 92%로 대부분의 효소활성도가 cytosolic fraction에서 나타났다. 또한 arginine decarboxylase와 ornithine decarboxylase의 specific activity를 살펴보면 (Table 4)entire cell에서보다 cytosolic fraction에서 더 높은 효소활성도가 나타나는데 이는 entire cell에서 나타나는 효소활성도는 효소활성도가 가장 높은 cytosol과 효소활성도가 극히 낮은 subcellular organelle의 homogenate가 섞여있는 상태인 것과 cytosol fraction의 단백질량이 entire cell보다 적은 것에 기인하는 결과라고 사료된다. 이러한 결과로부터 arginine decarboxylase와 ornithine decarboxylase는 거의 대부분이 cytosol에 분포되어 있음을 알 수 있으며 이는 Table 1에서 세포내 polyamine이 cytosol에 분포되어 있다는 사실에 대한 증거를 제시해 주는 결과라고 생각된다.

적 요

시금치의 어린잎을 재료로 세포소기관에 존재하는 polyamine의 양과 polyaminc의 생합성에 관계하는 효소들의 세포소기관별 활성도를 조사하였다. 시금치의 잎에서는 spermidine이 가장 많았고 spermine, putrescine의 순으로 polyaminc이 존재하였다. 엽록체, mitochondria, 핵에서는 극히 소량의 polyaminc이 존재하였고 대부분의 polyaminc이 cytosol에 존재하였다.

Polyamine의 합성효소인 ADC와 ODC의 경우 ADC의 활성도가 ODC활성도보다 약 2배 정도 높게 나타났다. 이리써, 시금치잎에서의 polyamine의 합성은 주로 ADC의 경로를 통해 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 세포소기관별 ADC와 ODC의 분포를 살펴보면 ADC의 경우 엽록체, mitochondria, 핵에서 각각 2.7%, 2.1%, 1.9%의 극히 낮은 활성도가 나타났으며 cytosol에서는 전체 효소활성도의 94%가 나타났다. ODC의 경우도 ADC와 거의 유사한 경향을 나타냈다. 한편, polyamine의 분해효소인 DAO와 PAO의 활성도는 거의 나타나지 않았다. 이상의 결과로 시금치잎에 존재하는 polyaminc은 cytosol에서 합성되어 그 합성장소인 cytosol에 분포하고 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Altman, A., R. Friedman, D. Amir, and N. Nevin. 1982. Polyaminc effects and metabolism in plants under stress conditions. In *Plant Growth Substances*. Academic Press, New York. 483-494.
- Altman, A. 1982a. Retardation of radish leaf senescence by polyamines. *Physiol. Plant.* **54** : 189-193.
- Altman, A. 1982b. Polyamines and wounded storage tissue inhibition of RNase activity and solute leakage. *Physiol. Plant.* **54** : 194-198.
- Bachrach, U. 1970. Metabolism and function of spermine and related polyamines. *Ann. Rev. Microbiol.* **24** : 109-134.
- Bagni, N. and D. Serafini-Fracassini. 1974. The role of polyamines as growth factors in higher plants and their mechanism of action. In *Plant Growth Substances*. Hirokawa Publishing Co., Tokyo. 1205-1217.
- Bagni, N., P. Adamo, D. Serafini-Fracassini, and V. R. Villanueva. 1981. RNA, proteins and polyamines during tube growth in germinating apple pollen. *Plant Physiol.* **68** : 727-730.
- Bagni, N., D. Serafini-Fracassini, and P. Torrigini. 1982. Polyamines and cellular growth processes in higher plants. In *Plant Growth Substances*. Academic Press, New York. 473-482.
- Birecka, H., M. Birecka, E.J. Cohen, A. J. Bionti, and P.P. McCann. 1988. Ornithine decarboxylase, polyamines, and pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* and *Crotalaria*. *Plant Physiol.* **86** : 224-240.
- Chance, B. and A.C. Maehly. 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Method Enzymol.* **2** : 764-775.
- Chen, Y. H., C. Y. Lin, H. Chang, T.J. Guilfoyle and J.L. Key. 1975. Isolation and properties of nuclei from control and auxin-treated soybean hypocotyl. *Plant Physiol.* **70** : 540-543.
- Cohen, E., Y. Heimcr and Y. Mizrahi. 1982. Ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase activities in meristematic tissues of tomato and potato plants. *Plant Physiol.* **70** : 544-546.
- Douce, R., A.L. Moore and M. Neuburger. 1977. Isolation and oxidative properties of intact mitochondria isolated from spinach leaves. *Plant Physiol.* **60** : 625-628.
- Feircr, R., G. Mignon and J. Litvay. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrots. *Science.* **223** : 1433-1435.
- Federico, R., R. Angelini, A. Ccsta and C. Pini. 1985a. Determination of diamine oxidase in lentil seedlings

- by enzyme activity and immunoreactivity. *Plant Physiol.* **79** : 62-64.
- Federico, R. and R. Angelini. 1988. Distribution of polyamines and their related catabolic enzyme in etiolated and light-grown *Leguminosae* seedlings. *Planta* **173** : 317-321.
- Galston, A.W., A. Altman, and R. Kaur-Sawny. 1978. Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat protoplasts. *Plant Sci. Lett.* **11** : 69-70.
- Galston, A.W. and R. Kaur-Sawney. 1980. Polyamines and Plant cells. *WNPP.* **11** : 5-8.
- Galston, A.W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience.* **33** : 382-388.
- Goren, R., N. Palavan, H.E. Flores and A.W. Galston. 1982. Changes of polyamine titer in etiolated pea seedlings following red light treatments. *Plant Cell Physiol.* **23** : 19-26.
- Heimer, Y. Y. Mizrahi and U. Bchrach. 1979. Ornithine decarboxylase activity in rapidly proliferating plant cells. *FEBS Lett.* **104** : 146-149.
- Jarvis, B. C., S. Yasmin and M. T. Ccoleman. 1985. RNA and protein metabolism during adventitious root formation in stem cuttings of *Phaseolus aureus* cultivar berkin. *Physiol. Plant.* **64** : 53-59.
- Kaur-Sawney, R., H.E., Flores, and A.W. Galston. 1981. Polyamine oxidase in oat leaves: A cell wall localized enzyme. *Plant Physiol.* **68** : 494-198.
- Kaur-Sawney, R., L.M. Shin, T. Cegielska and A. W. Galston. 1982. Inhibition of protease activity by polyamines, relevance for control of leaf senescence. *FEBS Lett.* **145** : 45-49.
- Kyriakidis, D. 1982. Superinduction of cytosolic and chromatin bound ornithine decarboxylase activities of germinating barley seeds by actinomycin D. *FEBS Lett.* **146** : 193-196.
- Lin, P. 1984. Polyamine metabolism and its relation to response of the aleurone layers of barley seeds to gibberellic acid. *Plant Physiol.* **74** : 975-983.
- Montague, M., J. Koppenbrink, E. Jaworski. 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol.* **62** : 430-433.
- McCormick, F. 1988. Use of cell enucleation in the study of polyamine distribution and metabolism. *Advances in polyamine research.* Raven Press. New York.
- Naik, B. I. and S. K. Srivastava. 1982. Effect of polyamines on tissue permeability. *Phytochemistry.* **17** : 1885-1887.
- Pegg, E. A., and P.P. McCann, 1982. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* **243** Cell Physiol. **12** : C212-C221.
- Prakash, L., P. John, G.M. Nair and G. Pprathapasenan. 1988. Effect of spermidine and MGBG on *in vitro* pollen germination and tube growth in *Catharanthus roseus*. *Ann. Bot.* **61** : 373-375.
- Prouty, W. F. 1976. Ornithine decarboxylase inactivation in HeLa cells. *J. Cell Physiol.* **89** : 65-76
- Slocum, R. D. and A. W. Galston. 1985. Changes in polyamine biosynthesis associated with postfertilization growth and development in tobacco ovary tissues. *Plant physiol.* **79** : 336-343.
- Smith, T. A. 1975. Recent advances in the biochemistry of plant amines. *Phytochemistry.* **14** : 865-890
- Smith, T. A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36** : 117-143.
- Tewari, K. K. 1979. Chloroplast DNA in nucleic acids in plants. vol. **1** : 41-110.
- Torrigiani, P., D. Serafin-Fracassini, and N. Bagni. 1987. Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuber*. *Plant physiol.* **84** : 148-152.