

당근 현탁배양세포의 세포벽 형성에 있어서 다가양이온의 작용기작에 관한 연구

표병식 · *강영희
동신대학교 식품영양학과, *연세대학교 생물학과

Study on the Action Mechanism of Polycation in Cell Wall Formation of Suspension Cultured Cells of *Daucus carota*

Byoung Sik Pyo and *Hee Young Kang
Department of Food Nutrition, Dongshin University
*Department of Biology, Yonsei University

ABSTRACT

The aims of this study was to investigate the action mechanism of polycation on the β -glucan synthetase II (GSII) related to cell wall synthesis in suspension cultured carrot cells.

In the suspension cultured cells treated with poly-L-lysine(12 μ M) and poly-L-ornithine (12 μ M) having polycationic nature, GSII activity increased about 40% and 50% than that of the control respectively. And similar response was observed when ATP and NaF were treated. On the other hand, poly-L-lysine and poly-L-ornithine did not affect the membrane permeability. Phorbol-12-myristate-13-acetate(TPA), activator of protein kinase, increased about 35% and 1-(5-isoquinoliny)l sulfonyl)-2-methyl-piperazine(H-7), inhibitor of protein kinase, decreased about 30% of GSII activity than that of control. These results suggest that polycation plays a role in the cell wall synthesis by increasing GS II activity through phosphorylation.

서 론

식물 세포벽은 세포생장을 조절하며 인접해 있는 세포들과 서로 결합하므로써 외부 자극이나 세균 침입에 대한 보호벽 역할 뿐만 아니라 구조적인 지지를 한다(1). 이러한 세포벽의 형성은 세포분열을 통한 식물세포 증식에 우선적으로 선행되어야 할 중요한 과정으로 알려져 있다(2,3). 식물 세포벽 구성 성분 중 cellulose와 hemicellulose 및 callose는 β -glucan synthetase(GS)에 의하여 합성된다(4,5).

세포벽 합성에 관여하는 GS는 존재부위와 합성되는 물질에 따라 β -glucan synthetase(GSI)와 β -glucan synthetase II(GSII)로 나누어지며 GSI은 소포체와 골지체 및 coated vesicle 등에 존재하고 β -1,4-glucan으로 이루어진 cellulose 합성에 관여한다(6). 한편 GSII는 원형질막에 존재하며, β -1,3-glucan으로 이루어진 callose 합성하여 관여한다(7,8). 특히 세포질내에서 생성되어 세포벽내에 축적되고 cellulose의 전구체인 callose는 세포벽 발달과정의 특징이며, 세포나 조직의 회복기작에 관여하기

도 한다(9).

식물에서 Ca^{2+} 은 second messenger 또는 signal substance로서 그 중요성이 입증되고 있으며(3,10), "stimulus-response coupling" 효과를 일으켜 target enzyme를 조절하는 것으로 알려져 있다(11). 그 대표적인 예로 조직배양을 통한 배양세포에서 Ca^{2+} 이 세포벽 합성효소인 GSII의 활성을 증가시켜 세포벽 합성을 증진하였고(11), 당근 원형질체에서 Ca^{2+} 에 의해 세포벽 재생이 촉진되었다(13,14). 또한 protein kinase는 Ca^{2+} 에 의해 그 활성이 촉진되며, 이로 인하여 인산화를 일으켜 어느 특정한 효소의 활성에 영향을 미친다(1,15).

한편 polyamine은 식물과 동물 및 미생물에서 널리 분포되어 있는데 식물에서는 생장과 발생 및 분화에 있어 성장조절물질로서 작용하며(16,17), 특히 다가양이온의 특성으로 단백질과 핵산의 합성(18, 19) 및 유사분열을 활성화하며(20), 세포의 항상성 유지(21)와 동정생식(22), 과일의 성숙(23) 등에도 관여한다.

따라서 지금까지 발표했던 보고(12,13,14)에서 Ca^{2+} 과 polyamine이 세포벽 합성효소인 GSII의 활성을 촉진하여 세포벽 합성을 증진하였으므로 이들 물질이 실제로 어떤 특성으로 세포벽 합성에 작용하는지를 알아보기 위해서 본 연구에서는 Ca^{2+} 과 polyamine의 특성중 하나인 다가양이온의 특성을 지닌 chitosan(β -1,4-linked glucosamine)과 poly-L-lysine 및 poly-L-ornithine을 사용하여 이들 물질이 막투과성을 유발시켜 전해질이 세포내로의 유입으로 인한 세포벽 합성효소를 활성화 시킬 수 있는지, 또는 protein kinase를 통한 인산화 과정에 의한 세포벽 합성효소의 활성을 촉진시키는지 protein kinase의 활성제(TPA)와 억제제(H-7)를 이용하여 그 작용기작을 조사하므로써 다가양이온과 세포벽 합성과의 관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

당근 뿌리로부터 유기한 배양세포를 B5 고체배지에서 배양한 후 액체 배양배지로 계대배양시켜 100 strokes/min.으로 27°C 암소에서 진탕배양하여 실험재료로 사용하였다. 현탁배양세포들은 14일을 주기로 하여 계대 배양하였으며 실험재료로 사용할 때는 여과지로 세포들을 모아서 흡수지로 수분을 충분히 제거하였다.

당근 현탁배양세포의 동조배양

고체배양배지에서 현탁배양배지로 옮겨 6번 계대 배양한 당근 현탁배양세포들을 phosphate free 액체 배양배지로 옮겨 3일간 배양후 후 KH_2PO_4 의 최종 농도가 0.2mM 되게 만든 액체배양배지에서 24시간 배양하였다. 현탁배양세포들은 phosphate free 배지로 세척한 후 phosphate free 배지에서 4일간 배양시킨 다음 정상 액체배지로 옮겨서 배양하였다. 정상 액체배양배지로 옮긴 시점부터 배양일로 삼았다(24, 25).

세포내 전체 단백질 함량 측정

단백질 정량은 Lowry 등(26)의 방법을 이용하여 다음과 같이 전처리를 하였다. 세포들을 Whatman glass filter에 모아서 끓고 있는 70% ethanol로 두 번 씻은 다음 acetone으로 건조시켰다. 건조된 세포들과 glass filter를 1 M NaOH 용액으로 옮겨 85°C에서 90분 동안 열처리한 다음 여과해서 가수분해된 전체 단백질 함량을 측정하였다(27).

β -glucan synthetase의 추출과 활성 측정

Cerenius와 Soderhael의 방법을 일부 수정하여 효소의 추출과 활성측정을 시행하였다(7). 시료의 추출액은 1M sucrose, 4mM Na_2EDTA , 1mM DTT, 25 μ M GTP 등이 포함된 0.1M Tris 완충액(pH 8.0)을 사용하였다. 마쇄된 용액을 나일론 천으로 걸러서 여과액을 6,800g에서 15분간 원심분리하고 그 상등액을 다시 40,000g에서 45분간 원심분리해서 얻은 침전물을 Tris 완충액에 현탁하여 조효소로 사용하였다. 효소 반응은 추출한 조효소와 200 μ l의 uridine diphospho-D-[U- ^{14}C]glucose가 포함된 Tris 완충액을 27°C에서 2시간 반응시켰다. 효소 반응 중지를 위해 1 ml의 trichloroacetic acid를 첨가한 후 잘 혼합하여 이것을 Whatman GF/C glass filter로 여과한 후 반응하지 않은 기질을 세척해 내기 위해서 10% trichloroacetic acid 용액을 3ml씩 3번, 96% ethanol로 3ml씩 3번 세척하였다. 이 glass filter를 말린 후 15ml의 scintillation cocktail solution(PPO, POPOP, toluene, triton X-100)에 넣고 1시간 이상 방치한 후 scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

막투과성 측정

Young 등(28)의 방법을 수정하여 다음과 같이 시행하였다. 현탁배양세포를 모아서 1,500g로 5분

간 원심분리하여 다시 모아진 세포들을 incomplete medium(1mM NaH₂PO₄, 2% sucrose, pH 5.5)으로 4번 세척하였다. 이 세포들은 20분 동안 정착시킨 후 incomplete medium으로 현탁시켰다. 처리할 물질과 incomplete medium으로 이루어진 용액에 현탁배양세포를 넣은 후 100°C에서 부드럽게 흔들며 주면서 5분간 방치하고, 10,000g에서 2분간 원심분리한 다음 그 상등액을 260nm에서 spectrophotometer로 측정하였다.

Chitosan의 제조

Young 등(28)의 방법에 의해 게껍데기로부터 추출한 chitosan을 다음과 같이 제조하여 실험에 사용하였다. 1g chitosan을 90ml 0.1N acetic acid에서 계속 저어주면서 하루동안 방치한 다음 불용성 물질을 제거하기 위하여 27,000g에서 20분간 원심분리시킨 후 상등액을 5N NaOH로 pH 8.0이 될 때까지 첨가하여 침전물을 만들었다. 여기서 얻어진 침전물은 원심분리를 통해 증류수로 충분히 세척을 하였다. 여기서 얻어진 침전물은 0.1N acetic acid에 다시 녹인 후 증류수로 4일 동안 투석하여 acetic acid를 제거한 다음 사용하였다.

결과 및 고찰

당근 현탁배양세포의 동조배양

고체배양배지에서 현탁배양배지로 옮겨 6번 계대 배양한 당근 현탁배양 세포들을 phosphate free 액체 배양배지로 옮겨 3일간 배양한 후 KH₂PO₄의 최종농도가 0.2mM 되게 만든 액체배양배지에서 24시간 배양하였다. 현탁배양세포들을 phosphate free 배지로 세척한 후 phosphate free 배지에서 4일간 배양시킨 다음 정상 액체배지로 옮겨서 배양하였다. 정상 액체배지로 옮긴 시점부터 배양일로 삼았다.

현탁배양세포는 세포벽 형성에 대한 생화적 연구에 있어서 적절한 재료로 알려져 있다. 그 이유는 첫째 현탁배양세포는 거의 일정한 세포군집을 이루고 있으며, 둘째로 주로 일차 세포벽만을 가지고 있고, 셋째는 세포분열과 신장이 동시에 일어나기 때문이다(29). 한편 당근뿌리로부터 유기한 배양세포를 현탁배양한 후 세포주기를 인산결여 방법(24)을 이용하여 세포들의 동시성을 얻어 세포벽 합성효소의 활성 변화에 대한 정확성을 기하고자 하였다. 이러한 인산결여 방법을 이용했을 때 세포가 부풀어 오르고 정채기 단계의 특성을 갖게 되며(30), 대부분

의 세포들이 2번째의 인산을 결여시키므로써 유사분열 시기 바로 직후에 세포주기가 멈추게 된다(31). 따라서 세포벽 물질들의 가장 활발한 합성은 G1 시기에 일어나므로 실험의 정확성을 기하기 위해서 본 연구에 사용되는 모든 현탁배양세포는 동조배양을 실시하였다.

현탁배양일에 따른 GSII의 활성은 큰 변화는 없었지만 배양 10일 경에 4,080cpm/mg protein으로 가장 높아서(Fig. 1)이하 모든 실험은 10일간 배양한 현탁배양세포를 재료로 삼았다.

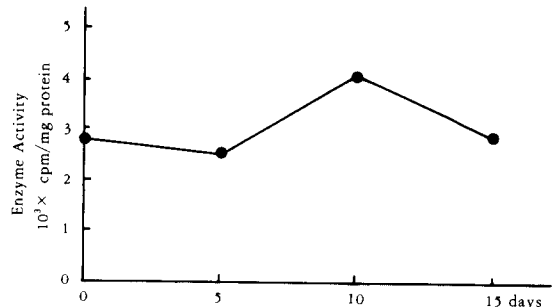


Fig. 1. The changes of the β -glucan synthetase II activity carrot suspension cultured cells on the time course.

한편 현탁배양세포의 전단백질 함량은 배양 초기에 높았으나 배양 10일 이후 부터는 6.5mg/g. fr. wt로 일정하였다(Fig. 2).

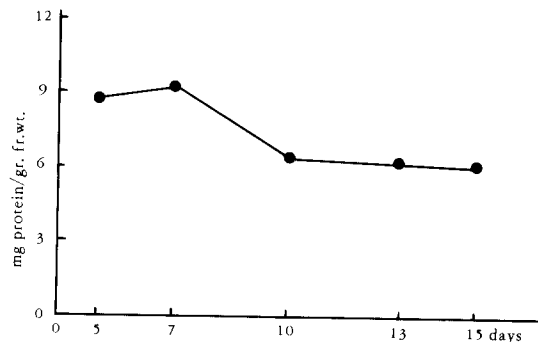


Fig. 2. The changes of protein content of carrot suspension cultured cells on the time course after subculture to the new medium.

다가양이온에 의한 GS II 활성의 변화

당근 현탁배양세포에 분자량이 각각 25,000인 12 μ M의 poly-L-lysine과 poly-L-ornithine을 처리하여 4시간 동안 배양시킨 후 GS II의 활성을 측정 한 결과 Table 1에서 나타난 바와같이 다가양이온의 특성을 가진 poly-L-lysine의 경우 50%, poly-L-ornithine은 40% 정도 효소활성이 촉진되었다. 한편 다가양이온의 특성이 없는 lysine과 ornithine은 효소활성에 거의 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 poly-L-lysine과 poly-L-ornithine이 protein kinase의 활성을 촉진하였다는 보고(32)를 고려해

볼때 다가양이온의 특성으로 protein kinase에 영향을 미쳐 인산화 과정을 통한 GS II의 활성을 촉진한 것으로 사료된다.

한편 다가양이온의 특성을 가진 chitosan을 현탁배양세포 1g당 1mg, 2mg을 각각 처리했을 때 10% 이내의 효소활성이 촉진되었다(Table 1). 또한 chitosan과 poly-L-lysine 및 poly-L-ornithine을 배양세포 1g당 각각 1mg씩 처리하여 4시간 동안 현탁배양한 후 막투과성을 측정 한 결과 대구조에 비해 약간의 증가를 보였을 뿐 큰 변화를 보이지 않았다(Table 2). Chitosan 역시 다가양이온의 특성을 가진

Table 1. The effect of poly-L-lysine, poly-L-ornithine, lysine and ornithine on β -glucan synthetase II activity of carrot suspension cultured cells. The cells were incubated for 4hr at 27°C in B5 medium. [14 C]-UDPGlucose used as a substrate and [14 C]glucan formed was measured. Poly-L-lysine and poly-L-ornithine were treated 1mg(12 μ M) per g. fr. w.

Treatment	GSII activity(cpm/mg protein)	
	cpm	% control
None	4,080	100
poly-L-lysine(M.W., 25,000)	6,208	152.0
poly-L-ornithine(M.W., 25,000)	5,785	142.0
lysine, 1 μ M	3,641	89.2
10 μ M	3,698	90.6
100 μ M	4,072	99.8
Ornithine, 1 μ M	4,300	105.4
10 μ M	4,141	101.5
100 μ M	4,161	102.0
Chitosan(1mg/g.fr.w)	4,370	107.0
Chitosan(2mg/g.fr.w)	4,474	110.0

Table 2. The effect of chitosan, poly-L-lysine and poly-L-ornithine on membrane permeability of carrot suspension cultured cells. The cells were incubated for 4hr at 27°C in B5 medium. Each treatment used 1mg per gfr. w. The O.D. value measured at 260nm.

Treatment	Membrane Permeability
None	0.34
Chitosan	0.37
Poly-L-lysine	0.39
Poly-L-ornithine	0.38

물질로서 세포벽의 구성 성분인 polygalacturonate에 결합하여 막투과성을 유발시키는 물질로 알려져 있으나(28,33) poly-L-lysine과 poly-L-ornithine과 함께 당근 현탁배양세포에서는 막투과성에 뚜렷한 영향을 미치지 않았다(Table 2). 결국 막투과성 유발에 의하여 양이온이 세포내로 유입되게 하므로써 효소활성이 촉진되었다기 보다는 다가양이온의 특성으로 인산화 과정을 통한 효소의 공유결합 변형 효과라고 사료된다. Chitosan에 의한 효소활성의 촉진율이 다른 다가양이온의 특성을 갖고 있는 물질보다 낮은 이유는 chitosan이 단백질 분해단계(proteolytic step)에 주로 관여하여 효소활성에 영향을 미친다는 보고(33)를 고려해 볼때 이 GS II는 proteolytic

step보다는 인산화과정을 통한 효소활성의 조절이라는 것을 확인시켜 주는 결과라 사료된다.

ATP와 NaF에 의한 GS II 활성의 변화

상기의 결과들에서 다가양이온에 의한 GS II 활성의 촉진이 인산화에 의한 것인지를 알아보기 위해서 단백질 인산화과정에 필요한 인산을 제공해 주는 ATP와 phosphatase의 활성 억제물질인 NaF(34)를 처리해서 현탁배양한 결과 1mM의 처리구에서 대조구보다 30% 정도 GS II의 활성이 촉진되었다(Table 3). 이는 ATP와 NaF가 인산화과정을 통해 GS의 활성을 촉진한다는 보고(35)와 일치하였고 ATP가 protein kinase활성에 기여하므로써 결국 인산화 과정을 촉진시켜 세포벽 합성효소의 활성이 증가하는 것이라 사료된다.

Table 3. The effect of ATP and sodium fluoride (NaF) on β -glucan synthetase II activity of carrot suspension cultured cells. The cells were incubated for 4hr at 27°C in B5 medium. [14 C]-UDPGlucose used as a substrate and [14 C]glucan formed was measured.

Treatment	GS II Activity(cpm/mg protein)	
	cpm	% control
None	4,080	100
ATP, 0.5mM	4,520	111
1mM	5,277	129
NaF, 1mM	5,568	137
10mM	5,119	126

TPA, H-7 의한 GS II의 활성변화

위의 결과들에서 다가양이온이 GS II의 활성에 어떠한 기작으로 영향을 미쳤는지를 알아보기 위한 것으로 protein kinase의 활성제인 phorbol-12-myristate-13-acetate(TPA)와 억제제인 1-(5-isoquinoliny) sulfonyl)-2-methyl-piperrazine(H-7)를 현탁배양 세포에 처리하여 4시간 동안 배양한 다음 GS II의 활성을 측정한 것으로(Table 4) TPA는 대조구에 비해 35% 정도 효소활성을 증가시켰으며 H-7은 약 30% 정도 억제시켰다. 이는 Ca^{2+} 에 의해 protein kinase의 활성이 촉진되었다는 사실(37,38)을 고려해 볼때 상기 결과들에서 다가양이온이 GS II의 활성을 촉진하였던 것은 protein kinase를 통해 인산화 과정을 거쳐

GS II의 활성을 증가시켜 주는 결과라 사료된다.

Table 4. The effect of ATP and H-7 on β -glucan synthetase II activity of carrot suspension cultured cells. The cells were incubated for 4hr at 27°C in B5 medium. [14 C]-UDPGlucose used as a substrate and [14 C]glucan formed was measured.

Treatment	GS II Activity(cpm/mg protein)	
	cpm	% control
None	4,080	100
ATP, 10 μ M	5,541	135.8
H-7, 25 μ M	2,803	68.7

2,6-dichlorobenzonitrile(DCB)에 의한 GS II 활성의 변화

Cellulose의 합성 억제제인 DCB는 세포내에서 1개 정도의 polypeptide를 지니는 수용체 단백질과 결합하여 세포분열 억제와 골지체 및 세포판 형성을 저해하는 물질로서(36) 당근 현탁배양매지 1L당 1mg에서 10mg까지 여러 농도를 처리해서 4시간 동안 현탁배양한 결과 모든 처리구에서 대조구보다 40~50% 정도의 GS II의 활성을 억제하였다(Table 5). 이는 callose가 주요 성분인 세포판 형성을 DCB가 억제한다는 사실과 관련시켜 볼때 cellulose의 합성 뿐만아니라 GS II의 활성을 억제하므로

Table 5. The effect of 2,6-dichlorobenzonitrile on β -glucan synthetase II activity of carrot suspension cultured cells. The cells were incubated for 4hr at 27°C in B5 medium. [14 C]-UDPGlucose used as a substrate and [14 C]glucan formed was measured.

Treatment	GS II Activity(cpm/mg protein)	
	cpm	% control
None	4,080	100
2,6-dichlorobenzonitrile		
1mg/L	2,636	65
2mg/L	2,099	51
5mg/L	2,220	54
10mg/L	2,025	50

써 이 효소에 의해서 합성되는 callose가 cellulose의 전구체라는 사실(9)을 확인시켜 주는 결과라 사료된다. 또한 DCB는 단백질 함량에는 별다른 영향을 미치지 않았다(Fig. 3)

감 사

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 이루어졌으며 교육부 당국에 감사 드립니다.

참고문헌

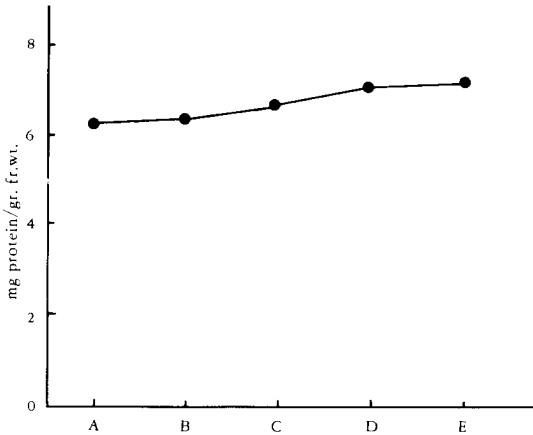


Fig. 3. The effect of 2,6-dichlorbenzonitrile(DCB) on protein contents in suspension cultured cells. The cells were incubated for 4hr at 27 °C in B5 medium.

A; control B; DCB, 1mg/L
 A; DCB, 2mg/L D; DCB, 5mg/L
 A; DCB, 10mg/L

요 약

당근 현탁배양세포에서 세포벽 합성 효소인 GSII의 활성화에 다가양이온의 작용기작을 조사하였다.

다가양이온의 특성을 가진 poly-L-lysine과 poly-L-ornithine은 GSII의 활성을 40~50% 정도 촉진시켰으며, ATP와 NaF도 이와 비슷한 결과를 나타냈다. 한편 poly-L-lysine과 poly-L-ornithine은 막투과성에는 영향을 미치지 못하였으며, protein kinase의 활성제인 TPA는 GSII의 활성을 대조구에 비해 35% 정도 증가시켰고 억제제인 H-7은 30% 정도 감소시켰다.

이러한 결과들은 다가양이온이 인산화 과정을 통해 GSII의 활성을 증가시켜 세포벽의 합성을 증진시키리라 사료된다.

1. M. G. Gregory, A. S. N. Reddy and B.W. Poovaiah(1988), *Plant Cell Physiol.*, **29**, 565.
2. R. D. Preston(1979), *Ann Rev. Plant Physiol.*, **30**, 55
3. H. Nishizono, K. Kubota, S. Suzuki and F. Ishii(1989), *Plant cell Physiol.*, **30**(4), 595
4. J. T. Mullins(1990), *Physiologia Plantarum*, **78**, 309.
5. J. Bonner and J.E.Vaner(1976), *Plant Biochemistry*, Academic Press. 405.
6. D. G. Robinson and H.Depta(1988), *Ann, Rev. Plant Physiol.*, **39**, 53
7. L. Cerenius and K. Soderhael(1984), *Physiol. Plant.* **60**, 247
8. G. Luttenegger and D. J. Mevins(1985), *Plant Physiol.*, **77**, 175.
9. M. Kauss and W. Jeblick(1986), *Plant Science*, **43**, 103.
10. K. Veluthambi and B. W. Poovaiah(1984), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **122**(3), 1374.
11. H. Kauss(1987), *Ann. Rve. Plant Physiol.*, **38**, 47.
12. S. H. Lee, Y. H. Kang, B. S. Pyo, Y. D. Cho, M. W. Kim and J. S. Lee(1987), *Kor. J. Bot.*, **30**(3), 173.
13. B. S. Pyo and Y. H. Kang(1988), *Kor. J. Bot.*, **31**(2), 83
14. B. S. Pyo and Y. H. Kang(1989), *Kor. J. Bot.*, **32**(4), 215.
15. A. M. Hetherington and A. Trewavas(1984), *Planta.*, **161**, 409.
16. S. Biondi, T. Diaz, I. Iglesias, G. Gamberini and N. Bagni(1990), *Physiologia Plantarum*, **78**, 474
17. I. Sinska and U. Lewandowska(1991), *Physiologia Plantarum*, **81**, 59.
18. E. Hiraswa and Y. Suzuki(1985), *Plant*

- Growth Regulation*, **3**, 239.
19. H. S. Basu and L. J. Marton(1987), *J. Biochem.*, **244**, 243.
 20. N. Palavan and A. W. Galston(1982), *Physiol. Plant*, **55**, 438.
 21. N. Bagni and M. Mengoli(1985), *Plant Growth Regulation*, **3**, 371.
 22. V. R. Villanueva, V. Mathivet and R. S. Sangwan(1985), *Plant Growth Regulation*, **3**, 293
 23. D. C. Teitel, E. Conen, S. Arad, E. Bironbaum and Y. Mizrahi(1985), *Plant Growth Regulation*, **3**, 309.
 24. S. Amino and A. Komamine(1985), *Plant Cell Physiol.*, **26**, 745.
 25. S. Amino, Y. Takeuchi and A. Komamine (1985), *Physiol. Plant*. **64**, 197.
 26. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall(1951), *J. Bio. Chem.*, **193**. 265 .
 27. H. E. Street(1977), *Botanical monographs*, California Univ. Press, 92.
 28. D. H. Young, H. Kohle and H. Kauss(1982), *Plant Physiol.*, **70**. 1449.
 29. H. Masuda, Y. Oziki, S. Amono and F. Ishii (1989), *Physiol. Plant*, **62**, 65.
 30. S. Amino, Y. Takeuchi and A. Komamine (1984), *Plant Physiol.*, **60**, 326.
 31. S. Amino. T. Fujimura and A. Komamine (1983), *Plant Physiol.*, **59**, 393.
 32. Y. S. Wong, H. C. Cheng, D. A. Walsh and J. C. Lagarias(1986), *J. Bio. Chem.*, **261**(26), 12089.
 33. H. Kohle, W. Jeblick, F. Potten, W. Blashek and H. Kauss(1985), *Plant Physiol.*, **80**, 7.
 34. R. J. A. Budde and R. Chollet(1988), *Physiol. Plant*, **72**, 435.
 35. G. Paliyath and B. W. Poovaiah(1988), *Plant Cell Physiol.*, **29**(1), 67.
 36. D. P. Delmer(1987), *Ann Rev. Plant Physiol.*, **38**, 259.
 37. E. A. Bornslaeger. W. Pouemirou. P. Mattei and R. M. Schultz(1986), *Exp. Cell Res.*, **165**, 507.