

## 過氧化酵素可作為水稻癒合組織植株再生之標誌酵素

黃文理<sup>1</sup> 劉麗飛<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 輔英科技大學生物技術系

<sup>2</sup> 國立台灣大學農藝學系

(接受刊載日期：中華民國九十四年十二月十二日)

本研究利用具高分化能力的水稻矮南早 39 為材料，探討在癒合組織植株再生過程中過氧化酵素活性變化與同功酵素之表現。結果顯示不論是可溶性或是與細胞壁結合之過氧化酵素活性均會隨培養天數增加而有上升趨勢，其活性變化與癒合組織線點及小苗形成有密切相關。此外，本研究建立以等電點電泳分析過氧化酵素同功酵素圖譜技術，發現在移到分化培養基後第一天，pI 4.5 同功酵素即明顯表現，而不具分化能力的細胞內則無此同功酵素表現。此外，pI 7.0 與 pI 7.5 同功酵素在芽體形成後有逐漸消失趨勢，顯示癒合組織不同發育階段有不同過氧化酵素表現，極適合作為水稻癒合組織植株再生之標誌酵素。

關鍵字：水稻，植株再生，過氧化酵素，同功酵素，等電點電泳。

## Peroxidase Isozymes Are Useful Markers of Shoot Regeneration in Rice (*Oryza sativa* L.) Callus

Wen-Lii Huang<sup>1</sup> and Li-Fei Liu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Fooyin University

<sup>2</sup> Department of Agronomy, National Taiwan University

(Accepted for publication: December 12, 2005)

We established the highly regeneration system in rice (*Oryza sativa* L. cv. Ai-Nan-Tsao 39, ANT39) callus. To explore the relationship between peroxidase and shoot regeneration, the activities and isoperoxidases pattern were determined in this study. The results showed that shoot regeneration in rice callus is accompanied by an increase in specific activity either soluble or cell wall-bound peroxidase. Besides, the peroxidase isozyme patterns are separated using isoelectric focusing (IEF) electrophoresis. It showed the pI 4.5 is the predominant isozyme at the first day on regeneration medium in highly regenerable callus. The pI 7.0 and pI 7.5 isozymes however are gradually disappeared at the late regeneration stage. These results indicate that different peroxidase isozymes expressed at callus and shoot regeneration stage can be easily monitored by IEF analysis. They should be as useful markers for shoot regeneration in rice callus.

**Key words:** *Oryza sativa*, Shoot regeneration, Peroxidase, Isozyme, Isoelectric focusing electrophoresis.

### 前言

植物細胞具分化全能性，亦即細胞經適當誘導可再生為完整植株，雖然相關的研究甚多，但關於再生的機制到目前為止尚無一定論<sup>(1)</sup>。早期的研究著重在分化條件之探討，亦即在培養基中添加不同濃度或不同比例植物荷爾蒙、碳源、或營養添加物，觀察對植株再生的影響<sup>(2)</sup>，近來則著重在和此分化全能性有關基因之選殖與表現的研究上<sup>(3,4)</sup>，並找出可能可

作為植株再生與否的指標，以提高植株分化率。

近年來因應植物基因轉殖技術普遍應用，各物種植株再生系統之建立已刻不容緩，尤其是重要的禾本科與豆科作物。由於同一物種不同品種或品系植株再生能力明顯不同<sup>(1,2,5)</sup>，近年來學者們不斷嘗試，針對培養細胞植株再生能力開發可信度高的篩選指標，期望縮短高再生能力品種之篩選時間。早期在水稻<sup>(6,7)</sup>與胡蘿蔔<sup>(8-9)</sup>已陸續建立特定蛋白質與體胚形成有關

\* Corresponding author. E-mail: lfliu@ntu.edu.tw

的生理指標，作者也發現分化初期高葡萄糖含量為水稻癒合組織植株再生重要因子<sup>(10)</sup>。近來學者們進一步尋找與植株再生有關之標誌酵素(marker enzymes)，例如在大麥中的 acid phosphatase、esterase 與 peroxidase (POD)<sup>(11)</sup>、苜蓿中的 phenylalanine ammonia-lyase<sup>(12)</sup>、玉米中的 catalase<sup>(13)</sup>、菸草中的 POD<sup>(14)</sup>、胡蘿蔔中的 chitinase 及 POD<sup>(15,16)</sup> 等均有顯著相關，本研究即擬針對 POD，探討其是否可作為水稻癒合組織植株再生的標誌酵素。

POD 普遍存在植物體中，具許多同功酵素(isozymes)，依其存在部位及蛋白質特性區分為可溶性(soluble form)、與細胞壁結合者(wall-bound form)及分泌到細胞外(extra-cellular form)共三大類<sup>(17-19)</sup>，隨不同發育時期、環境條件，在不同部位可能就有不同 POD 表現。近來 Passardi 等人<sup>(20)</sup> 研究發現在水稻基因組中至少有 138 個 POD 基因，為一數量龐大的基因族群(gene family)，其同功酵素甚多。一般認為 POD 可能與植物的發育、木質化(lignification)、老化、生長素的代謝、細胞壁結構及各種逆境的抗性有關<sup>(17-23)</sup>。近來由於生物技術的快速發展，有愈來愈多研究指出 POD 也在植物的生長與分化上扮演重要角色，然而不同物種間，POD 表現常無一致性，必須依各物種狀況探討之。許多研究顯示植株再生時，POD 活性或其同功酵素有變化，但活性究竟增加或減少則無一致的結論，且 POD 真正的作用為何亦不清楚。Thorpe 等人<sup>(24)</sup> 發現 POD 與菸草癒合組織器官形成有關，進一步發現特定的 POD 同功酵素可作為細胞分化的指標<sup>(25)</sup>，Kay 與 Basile<sup>(14)</sup> 利用菸草表皮細胞誘導器官形成也有類似結果。之後在蘋果<sup>(26)</sup>、棉花<sup>(27)</sup>、胡蘿蔔<sup>(16,28)</sup>、*Linum usitatissimum*<sup>(29)</sup>、*Phoenix dactylifera*<sup>(30)</sup>、*Zinnia*<sup>(31)</sup>、草莓<sup>(22)</sup> 等也有類似報導，惟上述各培養系統多數以水平式澱粉電泳(slab starch gel electrophoresis)或以原式蛋白質電泳分析(native polyacrylamide gel electrophoresis; native-PAGE)進行蛋白質分離，再進行 POD 活性染色，分離的效果有限，因此幾乎都是以手繪模式圖表示，無法真實地呈現結果。Pedersen 與 Andersen<sup>(11)</sup> 曾以等電點(isoelectric focusing; IEF)電泳分離大麥蛋白質，不過電泳解析度仍不理想。本試驗克服試驗操作上的困難，首度以 IEF 電泳原圖呈現水稻培養細胞 POD 同功酶分析結果，並分析在水稻癒合組織植株再生過程中 POD 活性變化，以探討 POD 同功酵素是否可作為水稻植株再生的指標。

## 材 料 與 方 法

### 一、植物材料與組織培養

吾人曾對不同水稻(*Oryza sativa* L.)品種進行植株再生能力篩選，發現矮南早 39 (Ai-Nan-Tsao 39; ANT39)是唯一在癒合組織誘導時不需滲透壓處理即具有 70%以上植株再生率的品種<sup>(5)</sup>。本試驗以 ANT39 為材料，取授粉後約 10-12 天左右的未成熟胚，接種在含 10  $\mu$ M 2,4-D 的 MS 基本培養基中<sup>(32)</sup>，於 28  $^{\circ}$ C 連續日照下誘導癒合組織，分別培養 7、14、21、28 天後，將癒合組織接種在分化培養基(MS 基礎培養基中添加 20  $\mu$ M kinetin 與 10  $\mu$ M NAA)，觀察植株再生情形，並於四週後調查植株再生率<sup>(10)</sup>。另外取兩週齡癒合組織移到分化培養基後 14 天內每天取樣、固定，進行各項酵素分析。

### 二、酵素萃取

將 0.1 g 的組織加入 0.5 mL、5% ampholyte (pH 3-10, Pharmacia)於研鉢中磨碎後，低溫下離心 15 分鐘，收集上清液，即可進行 soluble POD 酵素活性分析與 IEF 電泳分析。離心後的沈澱物，以 5 mM Tris-HCl (pH 7.0)含 1% Triton X-100 之緩衝液清洗一次，另以不含 Triton 之緩衝液再清洗兩次，最後以 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)含 3 M NaCl 之緩衝液將沈澱物充分懸浮後，置於 4  $^{\circ}$ C 中至少 12 小時，低溫離心後，收集上清液，進行 wall-bound POD 活性分析<sup>(14,17)</sup>，由於此樣品含高量離子，經數次透析後，仍無法順利進行 IEF 電泳分析(資料未示)，推測可能因為萃取液中 NaCl 濃度過高，導致此結果。

### 三、POD 活性分析

本試驗以分光光度計(U2000, Hitachi, Tokyo, Japan)呈色法於波長 470 nm 下測定 POD 酵素活性，soluble POD 反應液中包含 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、21.6 mM guaiacol、9 mM  $H_2O_2$ 、及稀釋的萃取液，最後體積為 3 mL，反應從  $H_2O_2$  加入開始測定<sup>(31)</sup>。Wall-bound POD 活性測定如同 soluble POD 測定方法，惟以 100 mM  $NaH_2PO_4$  (pH 5.8)取代 Tris-HCl 緩衝液<sup>(17)</sup>。蛋白質含量測定依據 Bradford dye-binding 方法<sup>(33)</sup>，並以小牛血清蛋白為標準液。

### 四、IEF 電泳分析

IEF 電泳膠片中主要含 10% acrylamide、5% ampholyte (80% pH 3-6 與 20% pH 3-10)，以垂直式電泳系統進行 (mini-gel, Hofer)，電泳槽中以 20 mM NaCl 為陰極槽 (cathode) 緩衝液，10 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  為陽極槽 (anode) 緩衝液，每樣品固定注入 20  $\mu\text{g}$  蛋白質。膠片在樣品加入前，先以 500 volts 預跑 30 分鐘，形成 pH 梯度。樣品加入後，分別以 200、400、600、800、1,000 volts 進行 30 分鐘電泳，膠片取出後先以 100 mM sodium acetate (pH 4.5) 含 0.1% benzidine 之緩衝液平衡，再加入 0.007%  $\text{H}_2\text{O}_2$  呈色，等 POD 條帶出現後再終止反應<sup>(11,17)</sup>，並利用三明治法將膠片烘乾保存。

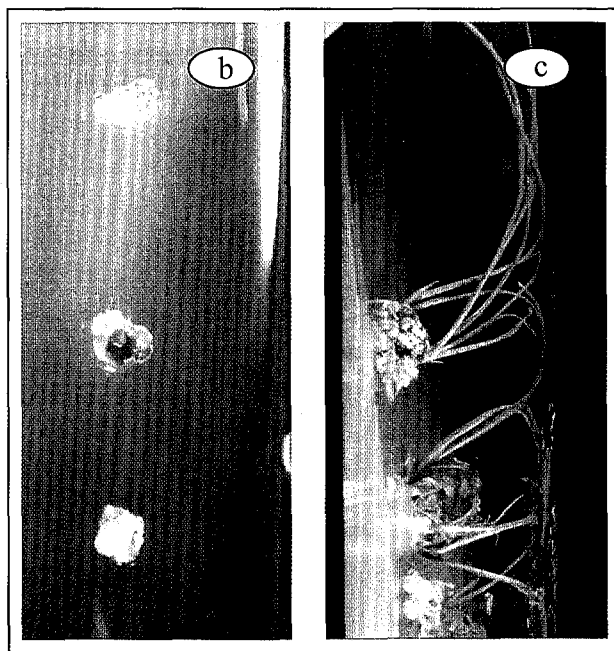
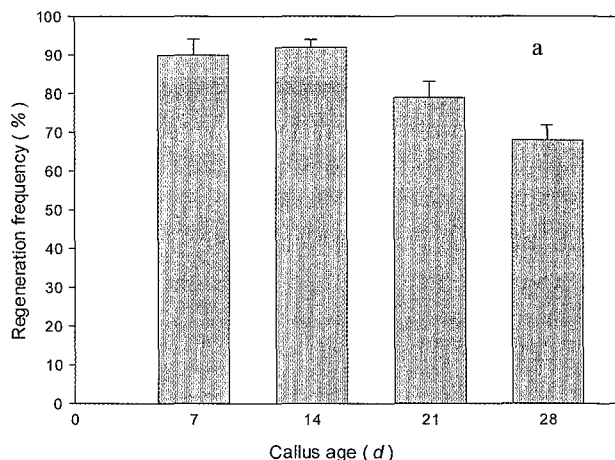
## 結果與討論

### 一、植株再生

本研究首先探討不同週齡癒合組織植株再生率變化，結果顯示將一週齡與二週齡癒合組織移到分化培養基後有高達 90% 以上植株再生率，隨著癒合組織週齡增加，植株再生率有逐漸下降趨勢 (圖一 a)，一般認為老化細胞不利於植株再生<sup>(1,2)</sup>。由於一週齡癒合組織太小，操作不易，因此後續試驗均取兩週齡癒合組織進行植株再生相關分析。將其移到分化培養基後三天即可見到綠點形成 (圖一 b)，約第 10 天左右於接觸培養基部位開始有芽體形成，四週後每個癒合組織平均約有 3 個小苗再生 (圖一 c)，此結果與之前的觀察類似<sup>(5)</sup>，此結果也顯示 ANT39 癒合組織極適合用來探討植株再生過程中 POD 之變化。

### 二、過氧化酵素 (peroxidase; POD) 活性分析

本研究分析水稻癒合組織植株再生過程中 soluble POD 與 wall-bound POD 酵素活性變化，結果顯示不論是 soluble POD 或 wall-bound POD 均隨培養天數增加酵素活性有增加的趨勢，而且 wall-bound POD 活性顯著高於 soluble POD (圖二)。而當第 10 天芽體形成後，POD 活性有顯著上升的趨勢，分化後期會再逐漸下降。El Hadrami 與 Baaziz<sup>(30)</sup> 指出高 POD 活性有利於 *Phoenix dactylifera* 體胚形成，在 *Hevea brasiliensis*<sup>(34)</sup>、萵苣<sup>(35)</sup>、胡蘿蔔<sup>(16,28)</sup>、草莓<sup>(22)</sup> 等都有類似報導。

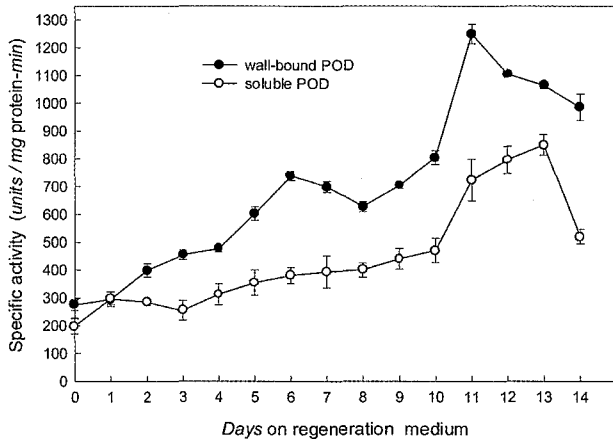


圖一 水稻癒合組織植株再生情形

Fig. 1. Shoot regeneration in ANT39 rice callus. a, the callus derived from ANT39 immature embryos inoculated on MSD<sub>10</sub> medium for 7, 14, 21, and 28 days, respectively, then, were transferred to regeneration medium. b and c showed the fourteenth-days callus was transferred to regeneration medium for 3 days and 28 days, respectively. Vertical bars represent standard errors (n = 3).

### 三、POD 同功酵素分析

本研究利用 IEF 電泳進行可溶性蛋白質分離，再進行 POD 同功酵素活性染色分析，因此所有在膠片上出現的條帶，均是不同等電點之 POD 同功酵素。結果顯示將癒合組織移到分化培養基後第一天，pI 4.5 的 POD 同功酵素即明



圖二 水稻癒合組織植株再生過程中過氧化酵素活性變化

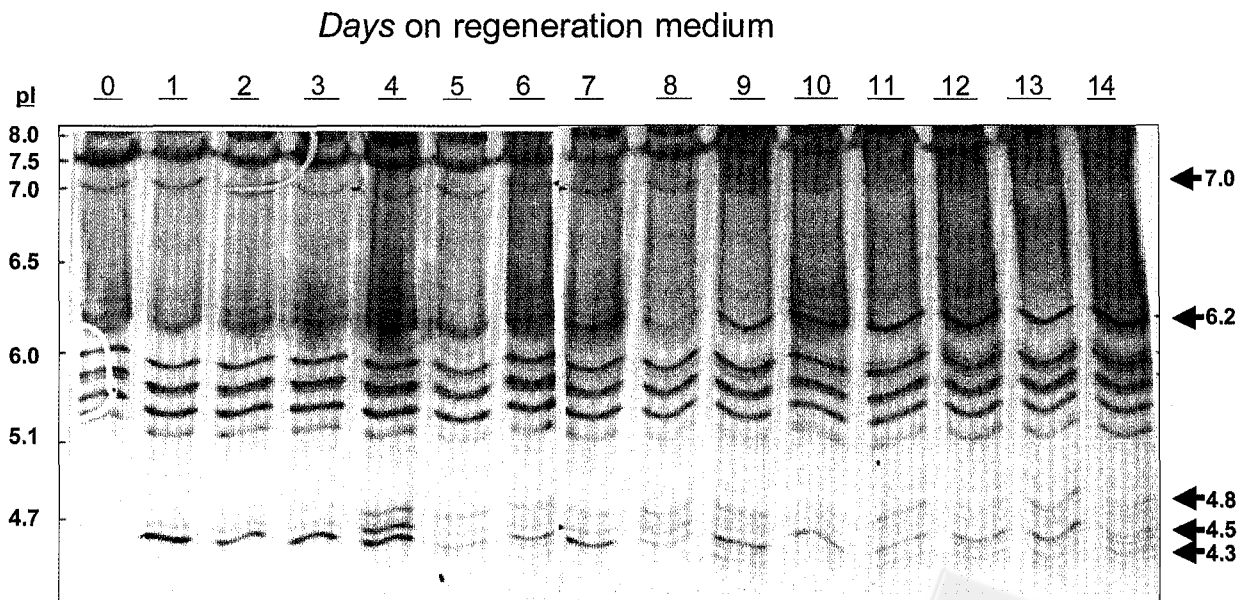
Fig. 2. Changes of specific peroxidase activities in rice callus during shoot regeneration. Vertical bars represent standard errors ( $n = 3$ ). Only those standard bars larger than the symbol are shown.

顯表現，此顯著表現的情形在第 5 天逐漸趨緩，之後其表現則大致維持恆定直到植株再生(圖三)。而在第 10 天芽體形成後，可發現 pI 6.2 同功酵素的表現愈來愈明顯，以 densitometer 定量分析後可知其表現量比芽體形成前平均約增加 3-4 倍；此外，在 pI 4.3-4.5 附近的一群同功酵素在芽體形成後也有慢慢出現的趨勢(圖三)。相反地，結果也顯示 pI 7.5 及 pI 7.0 的 POD 同功酵素在芽體形成後似乎有慢慢消失

的趨勢(圖三)。

由圖二酵素活性分析結果顯示在培養第 10-13 天芽體形成後可溶性 POD 活性有明顯增加趨勢，直至第 14 天活性才又下降，而在圖三等電點電泳分析上雖有部分 POD 同功酵素表現量增減，但並未有如圖二活性分析如此明顯差異呈現，推測等電點電泳分析主要是觀察不同同功酵素圖譜差異，無法明確了解特定同功酵素對整體活性的影響，尤其是像 POD 這類同功酵素眾多的酵素，分析上可能更為困難。

綜合上述結果，作者認為 pI 4.5 的 POD 同功酵素在癒合組織誘導階段並不會出現，但在移到分化培養基後第一天即明顯表現，在作者利用高滲透壓處理促進水稻植株再生的培養系統中也有類似的結果，而不具分化能力的水稻癒合組織中則無此 POD 同功酵素表現(Huang and Liu, unpublished data)，此結果顯示 pI 4.5 的 POD 同功酵素與水稻癒合組織植株再生有密切相關。此外，在作者利用水稻懸浮細胞的再生系統中也發現此 pI 4.5 POD 同功酵素表現，因此，此 pI 4.5 的 POD 同功酵素可能可作為水稻培養細胞植株再生的標誌酵素，甚值得進一步研究。Thorpe 與 Gaspar<sup>(25)</sup> 首先指出特定的 POD 同功酵素可作為菸草細胞分化的指標，之後在蘋果<sup>(26)</sup>、棉花<sup>(27)</sup>、胡蘿蔔<sup>(16, 28)</sup>、*Linum usitatissimum*<sup>(29)</sup>、*Phoenix dactylifera*<sup>(30)</sup>、*Zinnia*<sup>(31)</sup>、草莓<sup>(22)</sup>等也有類似報導。



圖三 水稻癒合組織植株再生過程中可溶性過氧化酵素同功酵素分析

Fig. 3. Developmental expression of soluble peroxidase isozymes in rice callus during shoot regeneration. Peroxidase isozymes were separated by isoelectric focusing electrophoresis. The gel was stained with benzidine- $H_2O_2$  (pH 4.5). Isozymes described in the right are marked by their isoelectric points. Light and bold arrow indicate the isozymes expression decreased and increased, respectively.

至於 POD 在植株再生過程中扮演的角色雖仍不清楚，一般認為高 POD 活性可能促進內生生長素分解，導致 cytokinin/auxin 比例改變，有利於植株再生<sup>(2, 24, 30)</sup>。此外，POD 亦被認為與細胞壁結構緊密有關<sup>(2, 20, 36, 37)</sup>，Van Engelen 與 De Vries<sup>(38)</sup> 以胡蘿蔔懸浮細胞為材料，從體胚形成的培養基中分離出一 38 kD 蛋白質，經證實是 wall-bound POD，將其添加到受 tunicamycin 抑制體胚形成的細胞中，可恢復其體胚形成能力，直接證明 POD 確與植株再生有關，推測 POD 會促使細胞壁木質化，木質素累積，在細胞外圍形成一特殊結構，誘導管胞分子 (tracheary elements) 形成，有利於體胚形成<sup>(15, 16, 38)</sup>。本研究發現 pI 4.3 至 pI 4.5 附近有一群 POD 同功酵素與植株再生有關，依其等電點特性，推測這些 POD 應亦與維持水稻癒合組織細胞壁緊密構造有關。

雖然 POD 同功酵素可作為植株再生標誌酵素的研究已有許多成功例子，惟上述例子幾乎都是利用澱粉電泳或是原態蛋白質電泳 (native-PAGE) 進行蛋白質分離，再進行 POD 活性染色，且都是以模式圖呈現結果。本研究曾利用 native-PAGE 進行相關分析，無法有效分離水稻培養細胞內蛋白質 (資料未示)，進一步利用 IEF 等電點電泳進行水稻癒合組織 POD 同功酵素分析，獲得十分顯著結果，此技術甚值得進一步應用於不同植物培養系統上，預期將有助於篩選各培養系統中具高植株再生能力之組織。

## 誌 謝

本研究承蒙行政院農業委員會 (93 農科-4.1.2-糧-Z5) 經費補助，特此謝忱。

## 參 考 文 獻

- (1) M. A. J. Toonen and S. C. De Vries: Initiation of somatic embryos from single cells. In: *Embryogenesis, the generation of a plant* (T. L. Wang and A. Cumming eds.), pp. 173-190. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK (1996).
- (2) M. Tran Thanh Van: Controls of morphogenesis in *in vitro* cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**: 291-311 (1981).
- (3) R. B. Goldberg, S. J. Barker and L. Perez-Grau: Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, **56**: 149-160 (1989).
- (4) A. J. De Jong, D. L. Ed Schmidt and S. C. De Vries: Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, **22**: 367-377 (1993).
- (5) W. L. Huang, Y. C. Tsung and L. F. Liu: Osmotic stress promotes shoot regeneration in immature embryo-derived callus in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agri. Assoc. China*, **3**: 76-86 (2002).
- (6) L. J. Chen and D. S. Luthe: Analysis of proteins from embryogenic and nonembryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci.*, **48**: 181-188 (1987).
- (7) W. L. Huang and L. F. Liu: Changes of protein patterns during rice (*Oryza sativa* L.) callus induction and shoot regeneration induced by high concentration of sucrose. *Chinese Agron. J.*, **9**: 221-231 (1999).
- (8) J. H. Choi and Z. R. Sung: Two-dimensional gel analysis of carrot somatic embryogenic proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **2**: 19-25 (1984).
- (9) J. H. Choi, L. S. Liu, C. Borkird and Z. R. Sung: Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 1906-1910 (1987).
- (10) W. L. Huang and L. F. Liu: Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **43**: 107-113 (2002).
- (11) S. Pedersen and S. B. Andersen: Developmental expression of isozymes during embryogenesis in barley anther culture. *Plant Sci.*, **91**: 75-86 (1993).
- (12) M. Cvikova, L. Mervy, L. Machackova and J. Eder: Phenylalanine ammonia-lyase, phenolic acids and ethylene in alfalfa (*Medicago sativa* L.) cell cultures in relation to their embryogenic ability. *Plant Cell Rep.*, **10**: 251-255 (1991).
- (13) M. L. Racchi and C. Terragna: Catalase isozymes are useful markers of differentiation in maize tissue culture. *Plant Sci.*, **93**: 195-202 (1993).
- (14) L. E. Kay and D. V. Basile: Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol.*, **94**: 99-105 (1987).
- (15) B. J. De Jong, J. Cordewener, F. Lo Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. V. Van Kammen and S. C. De Vries: A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, **4**: 425-433 (1992).
- (16) J. Cordewener, H. Booi, H. Van Der Zandt, F. A. Van Engelen, A. V. Van Kammen and S. C. De Vries: Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, **184**: 478-486 (1991).
- (17) W. C. Fang and C. H. Kao: Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Sci.*, **158**: 71-76 (2000).
- (18) T. M. Lee and Y. H. Lin: Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots. *Plant Sci.*, **106**: 1-7 (1995).
- (19) P. Sharma and R. S. Dubey: Ascorbate peroxidase from rice seedling: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Sci.*, **167**: 541-550 (2004).
- (20) F. Passardi, D. Longet, C. Penel and C. Dunand: The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, **65**: 1879-1893 (2004).
- (21) W. Tang, L. C. Harris, V. Outhavong and R. J. Newton: Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Cell Rep.*, **22**: 871-877 (2004).
- (22) M. Tian, Q. Gu and M. Zhu: The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the

- process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sci.*, **165**: 701-707 (2003).
- (23) K. W. Yi and M. Y. Lee: Environmental stress-induced extracellular isoperoxidase RC3 from rice. *J. Environ. Biol.*, **24**: 17-22 (2003).
- (24) T. A. Thorpe, M. Tran Thanh Van and T. Gaspar: Isoperoxidases in epidermal layers of tobacco and changes during organ formation in vitro. *Physiol. Plant.*, **44**: 388-394 (1978).
- (25) T. A. Thorpe and T. Gaspar: Change in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus. *In Vitro*, **14**: 522-526 (1978).
- (26) R. G. Berger, F. Drawert, A. Kinzkofer, C. Kunz and B. J. Radola: Proteins and peroxidase in callus and suspension cultures of apple. *Plant Physiol.*, **77**: 211-214 (1985).
- (27) J. E. Mellon: Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures. *Plant Physiol.*, **95**: 14-20 (1991).
- (28) M. Joersbo, J. M. Andersen, F. T. Okkels and R. Rajagopal: Isoperoxidases as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. *Physiol. Plant.*, **76**: 10-16 (1989).
- (29) G. J. McDougall, D. Davidson and S. Millam: Alterations in surface-associated peroxidases during callus development and shoot formation in explants of *Linum usitatissimum*. *J. Plant Physiol.*, **140**: 195-200 (1992).
- (30) I. El Hadrami and M. Baaziz: Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L. *Biol. Plant.*, **37**: 197-203 (1995).
- (31) Y. Sato, M. Sugiyama, A. Komamine and H. Fukuda: Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidases from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. *Planta*, **196**: 141-147 (1995).
- (32) T. Murashige and F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-479 (1962).
- (33) M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254 (1976).
- (34) I. El Hadrami and J. d'Auzac: Effects of growth regulators on polyamine content and peroxidase activity in *Hevea brasiliensis* callus. *Ann. Bot.*, **69**: 323-325 (1992).
- (35) X. Zhou, Y. Han, W. Yang and T. Xi: Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledons. *Ann. Bot.*, **69**: 97-100 (1992).
- (36) S. C. Fry: Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **37**: 165-186 (1986).
- (37) P. E. Kolattukudy, R. Mohan, B. M. Aslam and B. A. Sherf: Plant peroxidase gene expression and function. *Biochem. Soc. Trans.*, **20**: 333-337 (1992).
- (38) F. A. Van Engelen and S. C. De Vries: Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends in Genet.*, **8**(2): 66-70 (1992).