

## NAA와 BA가 hybrid poplar(*p. nigra var. betulifolia X P. trichocarpa*)의 극성 분화에 미치는 영향

김 용 재 · \*김 명 원 · 강 영 희  
연세대학교 이과대학 생물학과, \*문리대학 생물학과

### The Effect of NAA and BA on Polar-Regeneration of Shoot in Hybrid Poplar

Yong Jae Kim, \*Myeong Won Kim and Young Hee Kang

Department of Biology, Yonsei University, Seoul

\*Department of Biology, Yonsei University, Wonju

#### ABSTRACT

The role of NAA(1-Naphthaleneacetic acid) and BA(6-Benzyladenine) in the adventitious shoot regeneration from *Populus* leaf segments and changes in the pattern of RNA and protein synthesis were investigated. The adventitious shoot regeneration occurred at the basal cut end of *Populus* leaf segments. This process was effected by many factors, including wounding culture conditions, light and plant growth regulators etc. The highest adventitious shoot regeneration frequency was obtained at 0.01mg/ℓ NAA with 0.2mg/ℓ BA. In this condition adventitious shoot started to regenerate on the 13th day of culture. The most optimal hormone composition for RNA and protein synthesis was 0.01mg/ℓ NAA with 0.2mg/ℓ BA. The content of RNA and protein was greater at the proximal part. In the course of adventitious shoot regeneration, the proteins associated with polar-regeneration appeared at the proximal part of *populus* leaf segment.

#### 서 론

대부분의 식물에서 발생, 생장시 극성을 나타내는데, 특히 조직 절편에서 유관속 분화는 뚜렷하게 극성분화를 나타내며, 잎의 절편 배양시 중늑의 기부 절단면에서 분화된다(10). 특히 포플라의 잎 중늑 배양에서는 기부에서 부정아가 형성되고 중늑을 micro-cross section하여 배양할 경우에도 부정아는 극성을 나타내는 등 (5) 절편의 크기, 형태에 상관없이 극성을 나타내었다. 이러한 부정아의 극성분화는 잎절편 유관속의 기부 절단면에서의 유조직 세포 분열에 의하여 형성되고 이것은 옥신의 극성이동에 의해 옥신이 기부에 축적되는 사실과 일치하므로 극성분화가 옥신과 밀접한 관계가 있다고 생각되어지며(10), 옥신 억제제인 TIBA NPA에 의해 옥신 극성이동이 억제될 뿐만 아니라 극성 분화도 억제되는 것으로 보아 옥신과 극성분화가 연관되

어 있음을 확실하게 해 준다(13, 15).

또한 식물세포의 극성분화는 생장부분의 세포벽 물질인 cellulose, pectin질 등이 부분적으로 분비되어 세포벽이 합성됨으로 세포극성이 나타난다는 보고(12)와 특히, *Acetabularia* cell의 경우 세포내 organelle의 분포가 고르지 않을 뿐 아니라 pH gradients가 형성되어 단백질 합성도 세포내에서 고르게 일어나지 않는다는 보고등은 세포분화및 생장에 대한 생리적 조절 작용을 밝히는데 있어서 중요한 자료가 된다.

식물의 조직배양을 통해서 유전자의 조절에 대한 연구가 최근 활발히 진행되어 오고 있는데, *Raphanus* 자엽으로 노화가 일어나는 동안의 gene expression의 변화에 대한 연구(3), *Vigna* 종자의 발아 시 일어나는 mRNA의 변화에 대한 연구 (1)와 *Solanum* 줄기 절편을 BA와 2, 4-D에서 배양하여 부정아를 유도할 때 일어나는 단백질의 변화에 대한

연구들은 식물의 분화 및 성장에 대한 유전자의 조절작용 기작을 밝히고 이에 관여하는 단백질의 정체를 밝히는데 있어서 중요한 자료가 된다. *Populus. sp.*에서 부정아의 형성에 auxin이 중요한 역할을 하며 특히 극성분화에 결정적 역할을 한다는 보고(4)와 조직의 종류, 크기, 형태 그리고 계절적인 요인 등 여러 요인에 대해서도 연구되어 왔으나 아직 극성분화에 대한 생리적 기작은 밝혀지지 않았다. 이에 본 연구에서는 극성분화가 잘 일어나는 hybrid *Populus*를 재료로 극성분화를 유도하면서 auxin (NAA)과 cytokinin(BA)이 shoot분화에 어떻게 조절 작용하는지 기부와 단부를 분리하여 유전자조절 작용을 연구하기에 앞서 poly(A)+RNA와 단백질 양상을 조사함으로써 shoot분화작용을 밝히는 일환이 되고자 본 실험을 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

Hybrid *Populus* (*P. nigra var. betulifolia* X *P. trichocarpa*, NE-299)를 25°C ± 1°C인 온실에서 16시간 빛을 주고 8시간 암상태에서 재배하여 terminal bud로부터 3번째 잎 중 길이 3cm 정도의 어린 잎을 실험의 재료로 사용하였다.

### 극성 분화 유도

극성분화는 재료를 무기염류와 vitamin 그리고 NAA(0.01mg/l) BA(0.2mg/l)를 포함하는 목본식물 배양배지 (7)에서 배양하면서 유도하였다. 재료로 사용된 잎은 70% ethanol용액에 1분간 소독한 뒤 다시 0.8% sodium hypochlorite용액에 3분간 멸균처리한 후 증류수로 3번 세척하여 사용하였다. 멸균한 잎을 중심으로 0.5cm의 절편을 취한 다음 절편 3개를 30ml의 배지에서 배양하였으며 전 과정은 무균상태에서 수행하였다. 배양조건은 16시간의 광기와 8시간의 암기로 하였으며 온도는 25°C ± 1°C로 유지하였다.

### NAA와 BA가 부정아 형성에 미치는 영향

NAA와 BA가 극성분화에 미치는 요인을 알아보기 위하여 극성분화 유도와 같은 방법으로 준비한 재료를 목본식물 배양배지에서 배양하여 수행하였다. 식물 호르몬의 조성은 NAA와 BA를 0.01mg/l : 0.2mg/l, 0.01mg/l : 0.1mg/l, 0.01mg/l : 0mg/l, 0mg/l : 0.2mg/l, 0.02mg/l : 0.2mg/l의 5가지

를 이용하였다. 배양한지 2주가 지난 후 형성된 부정아의 수를 기부, 중간부, 단부로 구분하여 해부현미경으로 관찰하였다. 각 부위의 구분은 잎 절편의 proximal part를 기부, distal part를 단부로 하였으며, 그 이외의 모든 부분을 중간부로 하였다.

### <sup>14</sup>C-NAA와 <sup>14</sup>C-BA의 흡수 및 분포

auxin과 cytokinin의 중추 절편내에서의 분포상황을 알아보기 위하여 <sup>14</sup>C-NAA와 <sup>14</sup>C-BA를 사용하였다. 목본식물 배양배지에 <sup>14</sup>C-NAA 0.005mg/l (272mCi/mole)와 unlabeled NAA 0.005mg/l (0.2mg/l) BA가 포함된 배지에 함께 넣었다. 마찬가지로 <sup>14</sup>C-BA 0.1mg/l (242mCi/mole)와 unlabeled BA 0.1mg/l (0.01mg/l) NAA가 포함된 배지에 함께 넣었다. 이러한 배양배지에서 조직절편을 24시간 48시간동안 각각 배양한 뒤 세개씩 각 부위별로 Scintillation fluid (PPO, 5.50g; POPOP, 0.1g; toluene, 667ml; triton X-100, 330ml)에 분류하여 넣고 liquid scintillation spectrometer (Packard, Tricard 330)로 그 방사능의 양을 측정하였다.

### RNA, Protein의 추출 및 정량

3cm 정도의 어린 *Populus*잎의 중추를 0.5cm의 절편을 만들어 목본식물 배양배지에서 배양하여 극성분화를 유도하면서 RNA와 단백질을 정량하였다. 식물 호르몬의 조성은 NAA와 BA를 0.01mg/l : 0.2mg/l, 0.01mg/l : 0mg/l, 0mg/l : 0.2mg/l의 3가지를 이용하였으며 RNA 및 단백질의 추출은 Schneider의 방법(11)을 일부 수정하여 시행하였다. 시료 200mg에 2.0M NaCl, 10mM EDTA를 포함한 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)5ml를 가하여 마쇄한 후 10% trichloroacetic acid 30ml를 가하고 10,000 X g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 10% tri-chloroacetic acid와 chloroform-methanol 혼합용액(2:1, v/v)으로 각각 3번씩 세척한 후 0.4M KCM 10ml를 가하여 37°C에서 18시간 동안 가수분해하였다. 가수분해 후 진한 염산 3.4ml와 10% trichloroacetic acid 10ml를 가하여 혼합한 다음 90°C에서 침전이 생길때까지 방치한 후 10,000 Xg에서 10분간 원심분리한 상청액을 RNA 정량에 사용하였다. 침전물에 다시 10% trichloroacetic acid 2ml를 가하고 90°C로 15분간 중탕한 후 10,000 Xg에서 15분간 원심분리한 상청액을 단백질 정량의 시료로 사용하였다. RNA의 정량은 orcinol용액을 시료에 가하고 90°C에서 10분간

중탕한 후 상온에 냉각하여 670nm에서의 흡광도를 통하여 비색 정량하였다. RNA 용액으로는 calf liver RNA를 사용하였다. 단백질 정량은 Lowry 등의 방법(9)을 따라 수행하였다.

#### Poly(A)<sup>+</sup>RNA 분리 및 정량

total RNA의 추출은 Logemann의 방법(8)을 일부 변형하여 시행하였다. 시료 200mg에 액체질소를 가하여 마쇄한 후 20mM Mes, EDTA, 50mM  $\beta$ -ME를 포함한 8.0M Guanidine-HCl buffer (pH 7.0) 1ml를 가한 후 10,000rpm에서 45분간 상온에서 원심분리한 후 RNA를 포함하는 상등부를 취한 후 ethanol 0.7ml와 1.0M acetic acid 0.2ml를 가하여 -20°C에서 침전이 생길때까지 방치한 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 3.0M sodium acetate(pH 5.2) 용액으로 두번 세척한 후 10,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 70% ethanol로 세척하여 남은 RNA 침전물을 가지고 poly(A)<sup>+</sup>RNA 분리에 사용하였다. Poly(A)<sup>+</sup>RNA의 분리는 Edmond 등 (1971)의 방법을 일부 변형하여 oligo(DT)-cellulose affinity chromatography의 방법으로 시행하였다. 위 과정에서 얻은 total RNA를 0.5M NaCl, 1mM EDTA (pH 8.0), 0.1% sarosinate를 포함한 20mM tris-HCl buffer (pH 7.6)로 미리 평형화시킨 oligo(dT)-cellulose column(1ml packed volume)에 올려 놓고 10ml/h의 속도로 용출시켰으며, column에 남은 poly(A)<sup>+</sup>RNA는 1mM EDTA (pH 8.0), 0.05% SDS를 포함한 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.6)로 용출시켰다. 위의 과정에서 사용된 모든 기기와 용액은 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리하여 사용했다.

#### 단백질 분석

단백질의 분석은 capillary eletrophoresis system (HPE 100, Bio-Rad)을 이용하여 NaOH에 용해된 단백질을 분석하였다. 극성분화 유도과 같은 방법으로 목본식물·배양배지에서 배양초기, 7일, 13일간 각각 배양하면서 수행하였다. 식물 호르몬의 조성은 NAA와 BA를 0.01mg/l : 0.2mg/l로 하였으며 증극의 크기는 0.5cm로 하였다. 시료 500mg에 1.0M sucrose, 56mM  $\beta$ -ME를 포함하는 0.2M Tris-HCl bufer (pH 8.5) 1ml를 가하여 마쇄한 후 11,00X g에서 10분간 원심분리를 하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 5% trichloroacetic acid 10ml로 세번 세척한 후 0.5N NaOH를 가하여 25°C에서 12시간동안 가수분해하였다. 이 시료를 capillary eletrophoresis system을 이용한 단백질 분석에 사용하였다. capillary cartridge는 20cm X 25 $\mu$ m를 사용하였으며 0.1M Tris-buffer (pH 8.5)를 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

포플라(*Populus nigra* var. *betufoia* X *Populus trichocarpa*)의 증극절편을 WPM(Woody Plant Medium, Lloyd and Mccown, 1980)에 배양하면 기부에서만 부정아가 형성되는 뚜렷한 극성분화를 보이는데 이러한 극성분화의 생리적 근본원인은 알려져 있지 않으나 분화가 일어나는 부위가 오옥신이 축적되는 기부와 일치하며(10) 오옥신 억제제인 TIBA나 NPA에 의해 오옥신 극성이동이 억제될 뿐만 아니라 극성분화도 억제되는 것은 생장 조절 물질인 오옥신이 극성분화와 연관되어 있음을 나타낸다(13, 15). 또한 Table 1에서와 같이 첨가된 NAA 농도에 따라 분화율이 상이하게 나타난 것은 역시 auxin이 극성분화와 관련이 있음을 시사한다.

Table 1. Effect of hormone composition on adventitious shoot formation from leaf midvein segment(0.5cm) of hybrid *populus*.

Hormone composition		Number of shoot			Total No. of shoot	Regeneration rate(%)	Time(days) for macroscopically visible bud
NAA	BA	proximal	middle part	distal part			
(mg/ l)							
0.01	0.2	6.00±0.94	·	0.36±0.62	6.36±1.56	95	13
0.01	0.1	3.66±0.52	·	0.47±0.57	4.13±1.09	47	14
0.01	0	0.91±0.23	·	·	0.91±0.23	1	·
0	0.2	1.16±0.23	·	·	1.16±0.23	2	·
0.02	0.2	5.74±0.86	·	0.41±0.53	6.15±1.39	83	15

이에 본 실험실에서는 배양중 증극 절편내 외부에서 처리한 NAA와 BA의 분포가 어떻게 변하는가를 조사하기 위하여 WPM  $^{14}\text{C}$ -NAA와  $^{14}\text{C}$ -BA를 처리하여 24, 48시간 배양한 뒤 각 부위별로 방사능량을 측정하였다.(Table 2). 24시간 배양하였을 때 단부, 중간부, 기부의  $^{14}\text{C}$ -NAA분포가 각각 23%, 24%, 53%로 기부의 농도가 다음 부위에 비해 높았다. 또한 48시간 배양한 경우 역시  $^{14}\text{C}$ -NAA는 기부에 축적되는 경향이였다.

Table 2.  $^{14}\text{C}$ -NAA and  $^{14}\text{C}$ -BADistribution in midvein segments(0.5cm) of hybrid *Populus*. Numbers indicate percent (dpm of each part/total dpm of explant  $\times$  100)

	Time(hours)	midvein		
		Proximal part	middle part	distal part
$^{14}\text{C}$ -NAA	24 hr	52.8 $\pm$ 5.2	23.9 $\pm$ 3.2	23.3 $\pm$ 5.3
	48 hr	53.6 $\pm$ 7.8	24.3 $\pm$ 5.0	22.1 $\pm$ 4.8
$^{14}\text{C}$ -BA	24 hr	36.7 $\pm$ 3.4	28.1 $\pm$ 3.2	35.2 $\pm$ 2.8
	48 hr	35.2 $\pm$ 2.7	30.2 $\pm$ 0.7	34.6 $\pm$ 2.8

한편  $^{14}\text{C}$ -BA의 분포는 24시간, 48시간 배양했을 경우 절편 모든 부위에 비슷하게 분포하였다(Table 2). 이는 부정이 형성에 첨가된 NAA와 BA의 조성이 중요 역할을 함을 말해주며 이러한 사실은 *Bras-*

*sia napus*에서 NAA와 BA가 내재된 auxin과 cytokinin의 합성에 영향을 주어 극성분화를 유도할 가능성을 시사해 준다.

외부에서 처리된 NAA나 BA가 부정이 극성 분화에 미치는 영향과 부정이 형성에 관련된 RNA나 단백질에 관여하는지 여부를 알아 보기 위하여 RNA, 단백질 등을 조사한 결과 Fig. 1~Fig. 9의 결과를 얻었다. NAA와 BA를 0.01mg/l : 0.2mg/l로 처리한 경우(Fig. 1, 4)에 RNA 및 단백질은 모두 배양 4일에서 10일까지 가장 높은 함량변화를 나타내었으며, 기부와 단부로 구분하여 비교하였을 경우에는 단부가 RNA 및 단백질의 함량은 높았으나 4일에서 10일까지의 상대적인 증가량은 분화되고 있는 기부가 더 높았다. 이는 배양 4일까지 10일 사이에 극성 분화가 일어나는 부위인 기부 절단면에서 세포분열이 왕성하게 일어나는 것과 밀접한 관계가 있음을 암시하여준다. 한편, BA만을 0.2mg/l로 처리한 경우(Fig. 2, 5)와 NAA만을 0.01mg/l로 처리한 경우(Fig. 3, 6)에 있어서는 대조구에 비해 67%의 수준에 달해 대조구의 단백질, RNA함량에 훨씬 못 미쳤고 정지상에 도달하는 시기도 늦었으며 곧 감소 현상을 나타내며 Table 1에 나타난 분화율과 RNA, 단백질 함량 변화는 일치하는 것으로 생각된다.

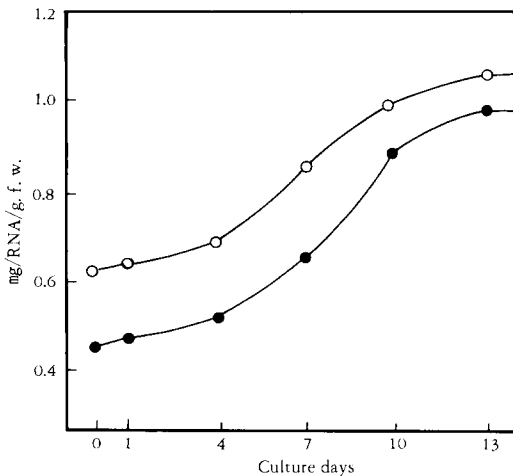


Fig. 1. Changes in RNA content of hybrid *Populus* cultured in WPM with 0.01mg/l NAA and 0.2 mg/l BA during 13 days of culture.

- : proximal part
- : distal part

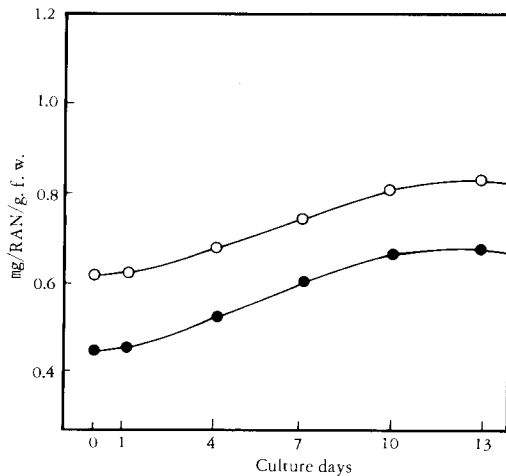


Fig. 2. Changes in RNA content of hybrid *Populus* cultured in WPM with 0.2mg/l BA and without NAA during 13 days of culture.

- : proximal part
- : distal part

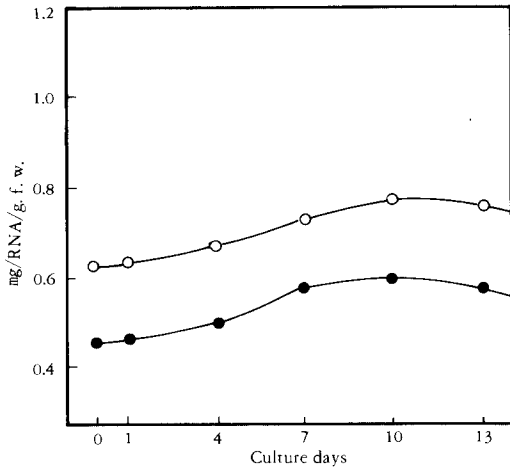


Fig. 3. Changes in RNA content of hybrid *Populus* cultured in WPM with 0.01mg/ℓ NAA and without BA during 13 days of culture.  
● : proximal part  
○ : distal part

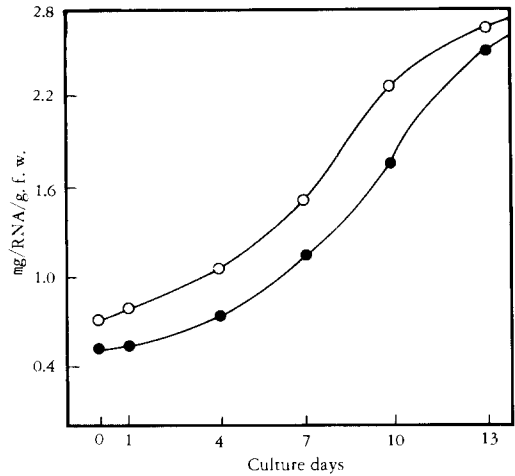


Fig. 4. Changes in protein content of hybrid *Populus* cultured in WPM with 0.01mg/ℓ NAA and 0.2 mg/ℓ BA during 13 days of culture.  
● : proximal part  
○ : distal part

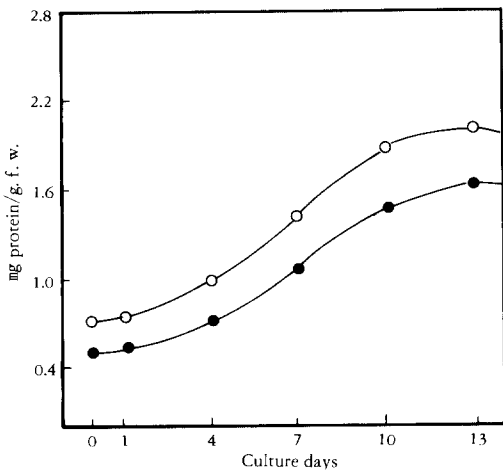


Fig. 5. Changes in protein content of hybrid *Populus* cultured in WPM with 0.2mg/ℓ BA and without NAA during 13 days of culture.  
● : proximal part  
○ : distal part

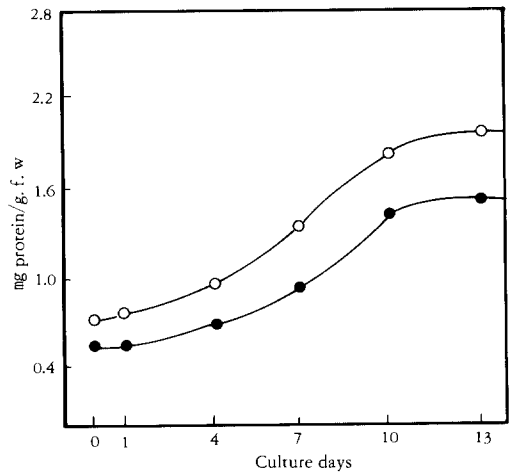


Fig. 6. Changes in protein content of hybrid *Populus* cultured in WPM with 0.01mg/ℓ NAA and without BA during 13 days of culture.  
● : proximal part  
○ : distal part

또한 total poly(A)<sup>+</sup>RNA의 함량 변화는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 6번에서 8번까지 12개의 분획과 41번에서 48번까지 8개의 분획에서 peak를 나타내었고, 6번에서 18번까지 12개의 분획에서의 peak가 41번에서 48번까지 8개의 분획에서의 peak보다

훨씬 높았으며 앞의 peak는 poly(A)<sup>-</sup>RNA를 나타내며 41~48번까지 8개의 분획에서는 poly(A)<sup>+</sup>RNA가 용출되었다. 한편 배양 초기 1, 7, 13일 배양하면서 poly(A)<sup>+</sup>RNA 함량변화를 조사하여 NAA와 BA의 조성에 따른 mRNA 합성변화를 본 결과를

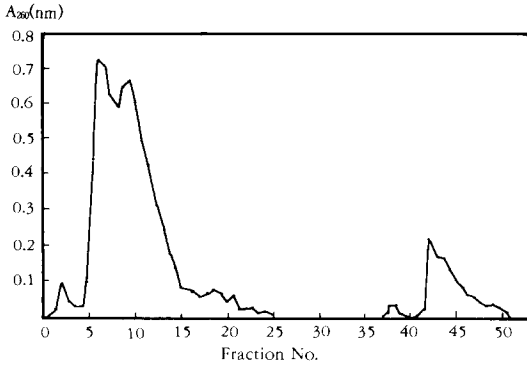


Fig. 7. Elution pattern of total RNA and poly(A)<sup>+</sup> RNA from oligo(DT)-cellulose chromatography.

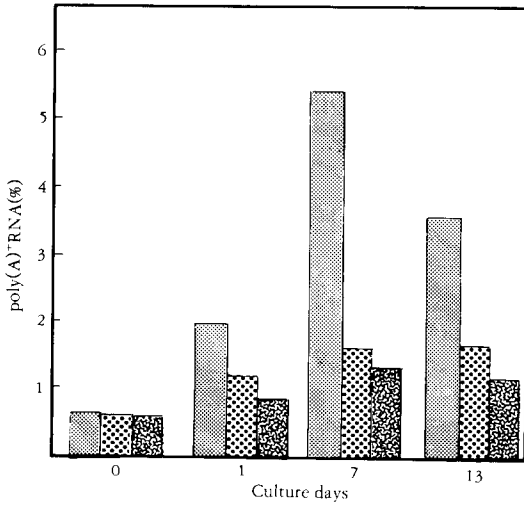


Fig. 8. Percent poly(A)<sup>+</sup>RNA in total RNA of WPM cultures. At specific intervals, total RNA was extracted from each treatment and poly(A)<sup>+</sup> RNA isolated. Results expressed as the percent poly(A)<sup>+</sup>RNA in the total RNA sample.

■ : NAA 0.01mg/l, BA 0.2mg/l  
 ▨ : NAA 0mg/l, BA 0.2mg/l  
 ■ : NAA 0.01mg/l, BA 0mg/l

Fig. 8에서 보는 바와 같이 poly(A)<sup>+</sup> RNA 함량이 NAA 0.01mg/l, BA 0.2mg/l 첨가한 실험구에서 가장 높았으며 배양 2일에서 특히 높았다. 이것은 극성분화에 관계할 것으로 생각되는 mRNA 및 단백질은 부정아가 나타나기 훨씬 이전인 7일경 합성되기 시작할 것으로 사려된다.

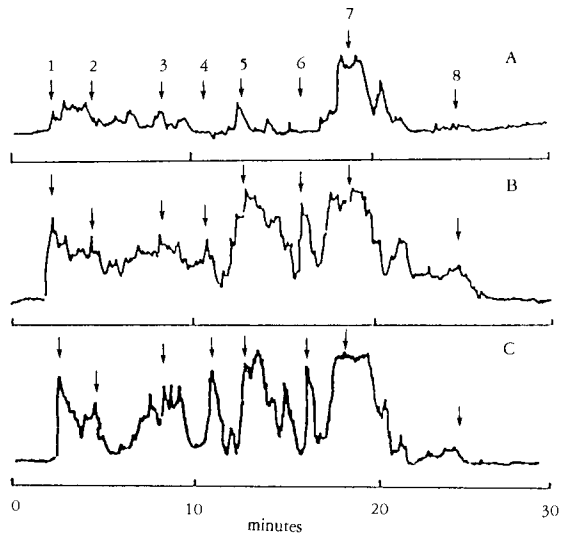


Fig. 9. Profiles of total soluble protein from basal stem segments of hybrid at 1 day of culture (A), then after 7 days(B) and 13 days(C) in WPM (NAA, 0.01mg/l : BA, 0.2mg/l) capillary cartilage: 20cm X 25μm buffer: 0.1M Tris-borate buffer, pH 8.5 run condition: 8KV detection: UV 200nm, 0.02AUFS

또한 poplar 잎 증능 절편을 NAA와 BA를 0.01 mg/l, 0.2mg/l 에서 배양하면서 HPE를 이용해서 단백질의 변화양상을 배양초기, 7일, 13일로 구분하여 분석한 결과 배양초기에는 여러 peak가 나타났으며 배양 7일과 비교했을 때 배양 초기에는 나타나지 않았던 peak가 나타났다(Fig. 9). 1번, 4번, 6번 그리고 8번은 배양 초기에는 나타나지 않았으나 배양 7일에 peak가 나타났으며 13일에는 그 peak의 강도가 증가하였다. 한편, 2번, 3번, 5번 그리고 7번은 배양초기에도 존재하였으며 7일 13일로 가면서 peak의 강도만 증가하였다. 따라서, 극성분화에 관계된 단백질은 이미 배양초기에 형성된다고 볼 수 있으며 분화의 결과로 생긴 단백질이 아니라는 것을 알 수 있다. 또한 2번, 3번, 5번 그리고 7번은 세포 내에서 극성분화와는 관계 없는 단백질일 것으로 추측된다.

이상의 결과들을 종합하여보면 poplar잎 절편으로부터의 부정아 유도에는 auxin(NAA)과 cytokinin(BA)의 상대적인 농도가 하나의 중요한 원인으로서 작용한다는 것과 극성분화에 특이적인 단백질이 어떠한 요인에 의해서인지는 모르지만 배양초기에 기부와 단부의 대사과정의 차이에 의해 형성되나 이러

한 극성분화에 특이적인 단백질의 정제와 극성분화를 일으키는 데 있어서 일어나는 세포내의 상호작용에 대해서는 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

Hybrid Poplar (*Populus nigra* var. *betulifolia* X *Populus trichocarpa*)의 잎절편을 목본식물 배양배지에서 배양하면서 기관분화를 위한 배양조건과 분화과정 중 부정아의 분화와 auxin(NAA)과 cytokinin(BA)과의 상호관계에 대해서 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Populus* 잎절편으로부터 부정아의 분화는 식물호르몬의 조성이 NAA 0.01mg/ℓ, BA 0.2mg/ℓ 일때 배양 후 13일 정도에서 기부 절단면으로부터 부정아가 효과적으로 유도되었다.
2. RNA와 단백질의 함량은 단부가 기부보다 높았으며 기부가 4일에서 10일까지의 상대적인 수치에서는 단부보다 높았다.
3. RNA와 단백질의 함량은 식물호르몬의 조성인 NAA, 0.01mg/ℓ; BA, 0.2mg/ℓ 일때 배양후 7일 정도에서 가장 높았다.
4. 표준 WPM에 조직 절편을 배양하였을 때 기부에서 배양시기가 경과함에 따라 특이한 단백질이 형성되었다.

## 감 사

본 연구는 1989년도 학술 진흥 재단 자유공모과제 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. N. Ishibashi and T. Minamikawa (1989) *Plant cell physiol.* **30**(3), 373-379.
2. D. J. James, A. J. Passey, and S. B. Malhotra

- (1984) *Plant Cell Tissue, Org. Cult.* **3**, 333-341.
3. N. Kawakami and A. Watanabe (1988) Changes in gene expression in Redish cotyledons during dark-induced senescence.
4. M. W. Kim, O. Y. Stademann, and W. P. Hackett (1991) Influence of poplar auxin transport on polarity of adventitious bud formation in Hybrid *Populus*. NATO ASI Series Vol. Woody Plant Biotech, Plenum Press, pp. 45-48.
5. O.Y. Lee-Stadelmann, S. W. Lee, W. P. Hackett and P. E. Read (1989) *Plant Sci.* **61**, 263-272.
6. J. R. Liu, K. C. Sink and F. G. Denis (1983) *Plant Cell Tiss. Org. Cul.***2**, 293-304.
7. G. Lloyd, and B. McCown (1980) *Comb. Proc. Int. Plant propagators Soc.* **30**, 421-427.
8. J. Logemann, J. Schell, and L. Willmitzer (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues.
9. O. H. Lowery, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and J. R. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 263-275.
10. K. Paterson (1983) *J. Bot.* **61**, 1058-1063.
11. W. C. Schneider (1957) Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In *Methods in Enzymology*. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (eds.). Vol. 3. Academic Press. New York. pp. 680-681.
12. E. Schnepf (1986) *Ann. Rev Plant Physiol.***37**, 23.
13. M. J. Smulders, A. F. Cross, and G. J. Wullems (1988) *Plant Physiol.* **88**, 752-756.
14. J.J. Song, M. W. Kim and Y. h. Kang (1992) in process.
15. J. Van Aartrijk, and G. J. Blom-Barnnorn (1984) *J. Plant physiol***116**, 409-416.