

Inverse PCR 技法을 이용한 양황철 DNA의 Regulatory Region의 探索^{1*}

孫碩奎² · 玄正悟²

Analysis of Upstream Regulatory Region from *Populus nigra* × *P. maximowiczii* by Inverse PCR Technique^{1*}

Suk Gyu Son² and Jung Oh Hyun²

要 約

이 研究는 promoter가 없는 外來 遺傳子를 양황철의 genome에 인위적으로 삽입시킨 후 도입된 遺傳子가 식물 프로모터의 영향으로 발현되는 현상을 이용하여 식물의 프로모터 혹은 遺傳子 발현조절 鹽基序列을 분리, 구명하기 위해 수행되었다.

형질전환된 세포의 선발을 위하여 nptII 遺傳子를 선발 표지로 사용하였고, 발현되는 遺傳子의 검정을 위한 reporter로는 GUS 遺傳子를 사용하였다. 형질전환 후 재분화된 3클론 중 nptII 및 GUS의 발현에 모두 양성인 개체의 DNA에서 730bp 鹽基序列을 inverse PCR로 증폭 분리하여 클로닝하고 이의 鹽基序列을 구명하였다. 이 鹽基序列은 *Eucalyptus gunnii*의 CAD(Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase) 遺傳子和 전체적으로 약 88%의 相同性을 보였다. 이 결과에 의하면 inverse PCR로 증폭된 부분은 포플러의 CAD 遺傳子의 일부를 포함한 조절인자로 생각된다. 이렇게 클로닝된 DNA 鹽基序列과 GUS fusion된 합성 DNA를 particle bombardment법을 이용하여 포플러 잎에 도입시킨 결과, 靑色斑點이 생성되는 것으로 보아, 분리된 부위가 식물체내에서 발현조절기능을 하는 일부분으로 작용하는 것으로 생각된다.

ABSTRACT

This research was conducted to identify plant regulatory regions by gene tagging method. A promoterless GUS coding sequence was introduced to *Populus nigra* x *P. maximowiczii* via *Agrobacterium* strains(LBA4404/EHA101), and putative transgenic poplars were selected by culturing on medium containing G418(60mg/ℓ) and by GUS assay. Among them one positive plant was to amplify the native sequences flanking to the introduced GUS gene in plant genome by inverse PCR method and from this 730 bp DNA product was obtained.

After subcloning and sequencing, it has 88% homology to the *Eucalyptus gunnii* CAD(cinnamyl alcohol dehydrogenase) gene. The GUS gene fused with the putative promoter reinserted into poplar leaves by particle bombardment method to test the functional promoter activity.

Upon staining with X-gluc, many blue spots appeared on the leaf segments bombarded by the chimeric gene 2-3 days, thus the isolated DNA fragment contain some possible coding region as well as a putative regulatory sequences of poplar CAD gene.

Key words : Populus, transformation, GUS gene, Inverse PCR, promoter region sequencing.

¹ 接受 1997年 11月 10日 Received on November 10, 1997.

² 서울대학교 산림자원학과 Department of Forest Resources, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

* 이 연구는 1994-1996년도 과학기술처 특정과제개발사업에 의해 수행된 것임.

緒 言

급격히 발달하는 분자생물학의 기술로 인해 농업 및 상업적으로 중요한 가치를 지니는 形質轉換體에 대한 관심이 최근 급증하고 있다. 遺傳子들이 시간적, 공간적, 혹은 환경적인 영향으로 발현되는 것은 그 유전자의 위쪽 부분에 존재하는 조절염기서열의 영향을 받기 때문이다. 이 부위들의 대표적인 요소는 promote라고 할 수 있으며, 이들 유전자가 특정 환경아래서, 특정 시기에, 특이 조직에서 또는 특이한 자극에 반응하여 발현되는지를 알다는 것은 유전자발현을 이용하는 유전공학연구에 있어서 가장 중요한 요인이라고 할 수 있다(Chun 등, 1995; Ellis 등, 1994).

유전자의 발현을 조절하는 조절염기서열은 먼저 유전자를 분리한 후 그 발현 양상을 토대로 그 역할을 규명하는 것이 순서이다. 그러나 최근의 몇가지 기법은 이러한 단계를 거치지 않고도 조절염기서열의 분석이 가능함을 제시하고 있다. 이중에서도 특히 gene tagging방법은 유전자를 분리, 동정하고 cloning할 때 쓰이는 대표적인 방법으로, 시기적, 공간적으로 특이하게 발현되는 유전자를 연구하고자 할 때 매우 효과적으로 사용된다. 최근에는 T-DNA를 이용하는 gene tagging 방법이 보고되었다(Koncz 등, 1989). 이 방법은 *Agrobacterium*가 자신의 유전자 일부인 T-DNA를 식물체의 genome속으로 집어넣어 식물체를 형질전환시키는 과정을 응용한 것으로 T-DNA의 삽입이 식물의 genome 상에서 활발히 전사(transcription) 곳에서 이루어지는 현상을 이용한 것이다. 이렇게 외래 유전자가 삽입된 부분에서 식물 유전자는 발현을 방해할 수도 있으나 이 유전자에 연결된 외래 유전자는 제대로 발현될 수도 있는데 이 때 발현의 성공 여부는 native 유전자의 개시 codon부터 계산하여 frameshift가 일어나느냐 아니냐에 달려 있다. 이러한 목적을 위해 여러 가지 reporter 유전자가 사용될 수 있다. 그 대표적인 것으로 chloramphenicol acetyl transferase(CAT), neomycin phosphotransferase II(*npt* II), β -glucuronidase(GUS), β -galatosidase, 그리고 luciferase 등을 들 수 있다(Scott 등, 1988).

본 研究는 도입된 外來 遺傳子(GUS)가 組織特異적으로 發現되는 regulatory region을 분리하고

이의 발현에 대한 기초적인 연구자료를 제공하고 자 수행되었다.

材料 및 方法

1. 共試 材料 및 植物體 再分化

식물재료는 산림청 임목육종연구소 구내에 식재된 양황철(*Populus nigra* X *P. maximowiczii*) 62-9 clone의 엽조직을 사용하였다.

形質轉換된 식물체를 얻기 위해 MS(Murashige T. and F. Skoog., 1962) 기본배지에 0.1 mg/ℓ NAA(naphthal-eneacetic acid), 0.5 mg/ℓ BAP(6-benzyladenine)를 첨가하고, 抗生劑는 60 mg/ℓ G418(geneticine)을 사용하였다.

2. 使用 菌株

양황철나무의 形質轉換을 위해 본 실험에 사용한 *Agrobacterium tumefaciens* host strain은 LBA4404와 EHA101이며, 양황철나무의 promoter tagging을 위한 binary vector는 포항공대 생명과학과 남홍길박사가 제작한 pOST2002를 사용하였다(Park 등, 1993)(Fig. 1).

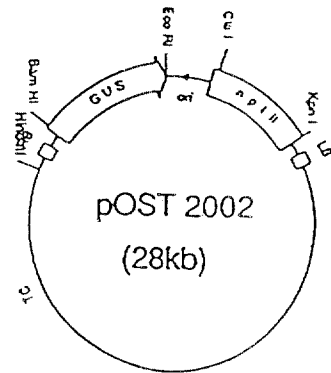


Fig. 1. The plasmid pOST2002 used for this study Promoterless GUS gene was placed near the right border of T-DNA.

3. 形質轉換 植物體의 PCR방법에 의한 확인

菌株 및 形質轉換植物體內에 GUS 遺傳子 및 *npt* II 構造遺傳子들이 제대로 삽입되어 있는지를 검증하기 위해 PCR 방법으로 검정하였다. 사용한 primer들은 아래의 Table 1과 같다.

PCR 반응은 Williams 등(1989)의 방법을 다음과 같이 변형하여 사용 하였다 10X reaction buffer는 promega사의 것을 사용하였고 여기에

Table 1. The primer pairs used for the amplification of GUS gene and npt II structural gene from putative transgenic poplar.

Oligonucleotides used as primers	faculty	sequence positions	Expected size of fragment
5' - GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG - 3' 5' - GTT TAC GCG TTG CTT CCG CCA - 3'	GUS 1 GUS 2	positions 400 → 420 and 1599 → 1579 in GUS gene	1.2 kb
5' - GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG - 3' 5' - ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA - 3'	npt 1 npt 2	positions 201 → 222 and 900 → 879 in NPT II gene	0.7 kb

Table 2. The primers used to amplify plant DNA sequences adjacent to inserted GUS gene

Oligonucleotide primers	source	sequence positions
GGC AAT AAC ATA CGG CGT GAC A	Xho II	positions 368 → 389 3' → 5'
GCG ACC TGC CAA GGC ATA TTG	SnaB I	positions 1677 → 1697 5' → 3'

Table 3. The primers used in the amplification of putative promoter, GUS gene, and NOS terminator from transgenic plant

Oligonucleotides used as primers	faculty	sequence positions
5' - GGC CCA TGA CAA AAT TGC CGC C - 3'	GUS	positions on putative promoter 1→22
5' - TTC TAT CGC GTA TTA AAT GTA T - 3'	NOS	terminator region of the NOS gene

200 μ M dNTPs, 200ng template DNA, 100ng primers, *Taq* DNA polymerase(1 Unit)를 혼합하였다. PCR반응은 92 $^{\circ}$ C 1분, 52 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분30초의 조건으로 30 cycle 실시하였다.

4. Southern analysis

선발된 형질전환체에서 genomic DNA를 분리한 후 Table 1의 primer를 사용하여 PCR로 증폭하고 증폭된 PCR 산물을 southern 분석에 사용하였다. Southern 분석은 Boehringer Mannheim社의 Digoxigenin(DIG) DNA 표지 및 Detection kit를 사용하여 제작사의 protocol에 준하여 실시하였다. Probe는 pBI121 5 μ g을 제한효소 *Pst* I, *Eco*R I으로 처리하여 얻어진 약 1.2kb 크기의 band를 gel에서 분리하여 제작사(BM)의 protocol에 근거하여 labelling한 후 사용하였다.

5. Inverse PCR

Inverse PCR은 Michael 등(1990)의 방법을 응용하여 실시하였다. 形質轉換된 식물체 DNA 18 μ g을 50 μ l 蒸溜수에 녹인 다음 제한효소 *Xho* II, *Sna*B I 40 units를 별도로 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 DNA를 T4 DNA ligase

를 처리하여 ligation 시킨 후 *Xho* II와 *Sna*B I 주변의 sequence(Table 2)를 사용하였고, Inverse PCR은 92 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초의 조건으로 수행하였다.

6. 鹽基序列 分析

증폭된 DNA 단편의 염기서열 분석은 Maniatis의 Silver staining 방법에 준하여 실시하였다(Maniatis, 1982).

이렇게 결정된 염기서열을 기존에 발표된 염기서열 자료와 비교하였다.

7. Putative promoter의 再 發現檢定

外來遺傳子가 삽입된 식물의 DNA에서 식물의 조절염기서열, 삽입시킨 GUS 유전자 및 NOS terminator가 한번에 증폭이 되도록 primer(Table 3)를 제작한 후 이를 이용하여 PCR을 실행하였다. 증폭된 DNA는 pBI 121에 subcloning한 후 particle bombardment 법을 이용하여 양황철 엽 조직에 주입하였다. 유전자 삽입을 위해 서울대학교 원예학과에서 자체 제작한 PIG(Particle Inflow Gun)를 사용하였다(Philippe 등, 1993). 온실에서 자란 양황철의 성숙한 잎을 agar 고체

MS배지가 들어 있는 petridish에 원형으로 잘라 넣은 후, 5 μ g의 plasmid DNA를 2.5 mg의 tungsten 25 μ l와 혼합하여 주입하였다. 주입 조건은 40-100 psi의 압력과 8-16 cm의 거리를 조합별로 이용하였으며, 주입후 48시간 동안培養한 후 GUS 組織化學的 分析을 실시하였다.

結果 및 考察

1. Southern hybridization

Fig. 2는 PCR 산물을 nylon membrane으로 전이시킨 후 DIG로 표지된 1.2 kb의 GUS 遺傳子를 probe로 하여 Southern 交雜反應을 수행한 결과로서 식물체 genome과 rearrangement로 인해 조금 증가된 약 1.4 kb의 band가 양성반응을 보인 것으로 미루어 遺傳子가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.

2. 形質轉換體의 檢定

pOST2002를 사용하여 형질전환시킨 식물체의 GUS의 histochemical 반응 결과는 callus단계에서 줄기로 분화되기 전, 즉 줄기와 callus와의 경계부분에서 양성반응이 나타났다. 완전한 식물체로 자란 상태에서 검정한 결과는 葉柄部分과 원줄기에서 GUS遺傳子가 發現됨이 관찰되었다.

한편 形質轉換된 植物體의 生長過程을 정상적인 식물체와 비교해 본 결과, 그 형태에 있어서 약간의 차이를 보였는데, 器內에서 배양한 점을 고려하더라도, 대개 생장이 늦고, 葉脈이 많이 형성되었으며, 주름이 지는 현상을 보이고 있었다.

3. Inverse PCR

Inverse PCR을 수행할 때 여러 가지 annealing

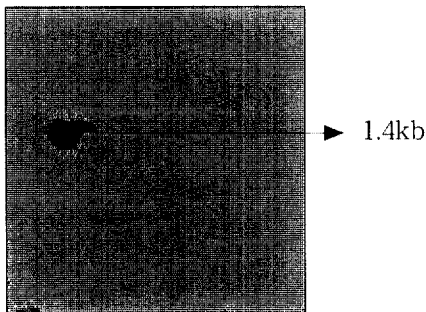


Fig. 2. Southern analysis of the amplified PCR fragment after hybridizing GUS gene probe

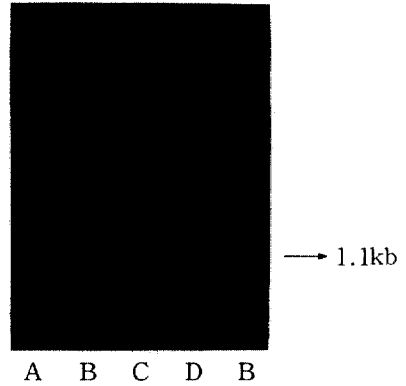


Fig. 3. Electrophotogram of inverse PCR. The upstream region of GUS gene was amplified with two primers(Xho II, SnaB I) deduced from GUS gene sequence by Inverse PCR.
 A : pGEM DNA marker
 B : target band both primer 1 and 2 were added.
 C : only primer 1(Xho II) was used.
 D : only primer 2(SnaB I) was used.

온도의 조합으로 실험한 결과 약 55°C 정도에서 가장 再現性이 높은 결과를 얻었다. 이 조건으로 primer annealing이 일어나는 지역의 DNA 염기서열을 증폭시킨 후 이를 전기영동한 결과 약 1.1kb 정도의 band를 얻었다(Fig. 3).

4. Putative regulatory sequence의 분리 및 염기서열 검정

Sanger(1977) 방식에 의한 silver staining 技法으로 730bp이후의 GUS sequence를 제외한 730bp에 대한 sequence를 얻었다(Fig. 4). 이 자료를 Internet상의 BLAST search program으로 조사하여 기존에 발표된 염기서열과 비교하였다.

이 결과를 살펴보면, 조사된 염기서열중 119번째부터 184번째까지의 66 DNA sequence가 *Populus deltoides*의 CAD(cinnamyl alcohol dehydrogenase, length=1305) 遺傳子와 80.3%의 상동성을 보였다(Fig. 4). 또한 *Eucalyptus gunnii*의 CAD 遺傳子와는 전체적으로 88% 정도의 類似性을 갖는 것이 확인되었는데, 이러한 결과는 본 실험에서 얻어진 sequence가, CAD 遺傳子와 아래쪽부분이나 위쪽부분에서 연결되어 있거나 또는 CAD 유전자 사이에 삽입되는 등 어떤 聯關性을 갖고 있다는 것을 의미한다. CAD 遺傳子는 리그닌의 전구물질인 cinnamyl alcohol의 합성을 촉진시

GGCCCATGAC AAAATTGCCG CCCCAAGCCA ATGAAATGCA⁴⁰
 ACAATAACA CAAACA TATAGTCCAAG ACTTGGACTC⁸⁰
 CAAGTCGACA TGCTTGTCGA TGCA CAATT TGGGCCATAA¹²⁰
 AATTGGGCAT GTTGGCATGT CAAACTGATC CTATGGTCGG¹⁶⁰
 TGGCAATGAA GTGGTTGGTC TAGAACTTGC AGGCATTAA²⁰⁰
 CACCGCCTCA ATGGATGTTC AAAGCTTTTC TGAACTCACG²⁴⁰
 ATGTTTCCAA AAAGGCGATG TTTTGTCTGAC AGAAGGAGCG²⁸⁰
 TTCGAGGGAG CTTCTCCATC ACTTAATTTG TCCCTTCAAG³²⁰
 ATGAATAAAG TAAGAGGTC ACTGTACCAA AACATCTTTC³⁶⁰
 CACCCAGAAG AAACAACAGT AGCTGGAGGG AGTCAAGCAT⁴⁰⁰
 GTCAGAAGCA CAGAAACTGG GAATGCCTAA AAAGCAAGTC⁴⁴⁰
 TTGACCCCTT AACCCACCC ACTGGTTCAC CTACCGCACC⁴⁸⁰
 TCTGGTTAGG TATTGTCTGC TGAGGTGTCA CTTTTCGCCA⁵²⁰
 AAGTCACGTC TCTCTATTGG ATTCTTCCTA TTGGTCCGTC⁵⁶⁰
 TCTTTCCTGC TTGCTGGTTG CTGGTAGCGT TTTTGTCCAA⁶⁰⁰
ATATATATGC AGTCCATATG TATCCCCGTC ACTCCTAATC⁶⁴⁰
 TCTGCTCCTA CCCGGCAACT TCCACTACG ATAAGAGCAA⁶⁸⁰
 GTTTACGGCT CTGTGCAATC TCTCTCCGAG CACCACTTTG⁷²⁰
 AAAGAAGCTT⁷³⁰ GGATCTTnnnn

Fig. 4. The sequences of 730 bp on a putative promoter region of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. TATA signals are shown in black box and CAAT signals are underlined. The GUS sequences are followed from the 731st.

키는 리그닌화(lignification)에 대한 특이 遺傳子인 것으로 알려져 있으며 이미 이 遺傳子에 대한 promoter의 sequence도 보고된 바 있다(Feuillet 등, 1995; Van Doorselaere 등, 1995).

본 실험은 단지 GUS 遺傳子의 發現을 기초로 하여 수행되었으므로 promoter가 없는 外來遺傳子가 식물체 DNA가 전사되고 있는 부분에 삽입된 것임을 고려할 때, 분석된 730bp는 외래유전자가 삽입된 식물체 CAD유전자의 일부분을 포함한다고 볼 수 있다. 즉 CAD유전자가 전사되

는 시점에 외래유전자가 삽입되었으며, 식물체 DNA의 전사를 유도하는 promoter의 영향을 받아 報告遺傳子인 GUS遺傳子가 發現되어 組織化學的 分析에 반응을 보인 것이다(Topping 등, 1994). 따라서 어느 한 부분이 잘린 GUS遺傳子의 위쪽 부분과 결합된 식물체 genome상의 일부가 분석되었고 이 중에는 promoter로서의 역할을 하는 sequence도 있을 것이라고 추측할 수 있다. 그리고 어느 부분이 TATATAT 및 CAAT signal이 될 수 있는지, 또는 분석된 부분보다 훨씬 위쪽에 있는지는 정확히 알 수 없으나 GUS 유전자가 발현되었으므로 이 부분이 발현조절 역할을 한다는 것을 전제로 TATATAT 및 CAAT signal을 표시해 보면 Fig. 3과 같다. 따라서 이 부분이 發現調節에 관여하는지를 확인할 필요가 있으며 이를 위해 transient expression을 검정하였다.

5. Putative promoter의 transient expression

염기서열이 분석된 形質轉換體의 putative promoter와 GUS 및 nos terminator(Tnos)가 포함된 부분을 bombardment법을 이용하여 양황철엽조직에 다시 주입하였다. 주입시 압력과 거리별 조합으로 실시한 결과, 9cm의 거리와 80 psi의 압력에서 청색반점의 수가 가장 많이 관찰되어(최대 5점/cm²) Kwon 등(1996)의 결과와 같게 나타났다(Fig. 6). 이 결과는 삽입된 외래遺傳子와 결합, 분석된 염기서열이 유전자 발현조절에 관여하며, 따라서 이부분은 식물체 genome상의 promoter region에 대한 일부 regulatory sequence를 포함하고 있음을 입증하는 것이다.

6. 결과의 분석 및 활용

BLAST search program으로 조사된 내용을 토대로 poplar CAD유전자와의 상동성을 Fig. 4

Query:
 119
 aaaattgggcatgttggcatgtcaactgatcctatggtcggtggcaatgaagtggttggctaga
 ||||| || ||| ||||||||| ||| ||||||||| ||||| ||||||||| ||
 aaaaatg---atcttggcatgtcacact-atcctatggtcctggccatgaagtggttgg---ga
 190
 Sbjct:
 184
 248

Fig. 5. The sequence homology of a part of 730bps to *P. deltoides* encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase(length=1305). * Identities=53/66(80.3%)

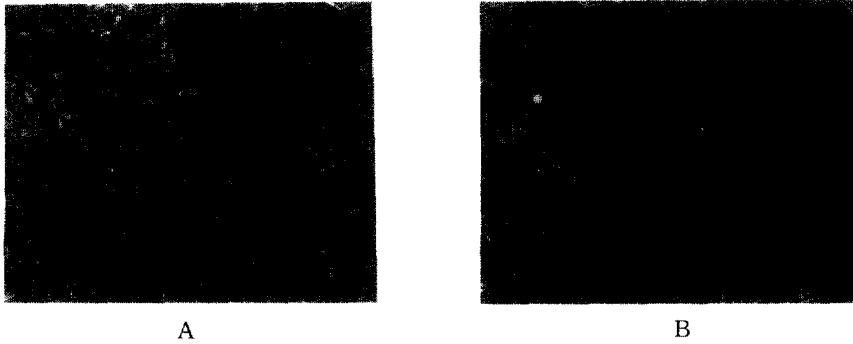


Fig. 6. A : negative control on *P. nigra* x *P. maximowiczii*
 B : transient expression of putative promoter on *P. nigra* x *P. maximowiczii*

에 표시하였다. 그림에 표시된 대로 730bp중 일 부분이 poplar CAD유전자와 상동성을 보인 반면, 다른 종인 *Eucalyptus*와는 전체적으로 비교적 높은 상동성을 보였다. 이런 결과는 두종간의 전체 유전자상동성이 어떤 상관이 있는 것이라는 추론을 가능케 하며, 또한 같은 종의 poplar CAD 유전자가 왜 일부에서 시작하여 어느 한 부분만 상동성을 갖는 것인지에 대하여는 차후 연구의 대상으로 삼을 수 있다. 또한 CAD유전자의 발현부위에 대해서도 특징적인데, Feuillet 등(1995)은 poplar를 대상으로 CAD promoter에 GUS遺傳子를 붙여 삽입시킨 결과 形質轉換된 식물체의 모든 기관에서 삽입된 GUS 遺傳子의 發現을 관찰할 수 있다고 하였다. 이 실험의 결과 외의 경우 잎맥(vein and mid-ribs)에서, 줄기의 경우 목부조직(xylem tissue), 뿌리의 경우 維管束(vascular cylinder) 등과 같은 곳 즉, 식물의 리그닌화가 활발히 진행되는 조직에서 모두 관찰되었다고 하였다(Feuillet 등, 1995). 이러한 결과는 CAD遺傳子가 식물의 리그닌합성이 이루어지는 곳에서만 조직 특이적으로 發現됨을 의미하는 것으로, 본 실험의 결과와 Feuillet 등(1995)의 결과가 일관되게 나타났다고 할 수 있다.

따라서 리그닌합성에 관여하는 유전자의 발현 부위에 외부 유전자가 위치하는 경우에 대한 정확한 기작의 연구를 위해 본 실험의 결과를 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

현재까지 알려진 promoter tagging 방법 중 하나가 T-DNA삽입에 기초한 방법이다. 이 방법은 transcriptional element가 없는 즉, promoterless constructs를 포함하는 외래유전자가 대상식물체의 promoter 아래쪽에 위치하게 되면, 외래유전

자에 포함된 보고 유전자가 transcription 되는 것을 이용하여 promoter를 분리, 동정하는 것이다. T-DNA 방법에 의한 이러한 promoter tagging 법에 의해 생성된 chimeric gene은 대상식물체 chromosome안의 특정부위에 자연적으로 위치하게 되어 어떤 식물체 promoter로 연결되어 구성될 것이다(Fobert와 Lyer, 1991). 그러므로 삽입된 유전자의 발현을 제어하는 식물체 promoter를 분리하여 그 sequence를 분석하면 외래유전자가 삽입되는 기작과 그 주변 염기서열을 알 수 있다. 이를 통해 유전자지도 작성, 돌연변이 유발, 전체 염기서열분석 등 cloning이나 mapping의 실험에 응용될 수 있을 것으로 기대된다(Ellis 등, 1994 ; Feuillet 등, 1995).

引用文獻

1. Bilodeau, P., J.G. Lafontaine., and G. Bellemare. 1994. Far up stream activating promoter regions are responsible for expression of the *BnC1* cruciferin gene from *Brassica napus*. 1994. Plant Cell Rep. 14 : 125-130.
2. Chun Y.W., and N.B. Klopfenstein. 1995. Organ specific expression of the *nos-NPT II* gene in transgenic hybrid Poplar. J. Kor. For. Soc. 84 : 77-86.
3. Datla R., J. Hammerlind, L. Pelcher, W. Crosby, and G. Selvaraj. 1991. A bifunctional fusion between β -glucuronidase and neomycin phosphotransferase : a broad-spectrum marker enzyme for plants. Gene. 101 : 239-246.)
4. Ellis, D.D., J.A. Rintamaki-Strait, and B.H.

- McCown. 1994. Expression of introduced genes in trees : practical and environmental considerations. pp.139-146. *In* 1994 Biological Sciences Symposium, TAPPI Proceedings, TAPPI Press Atlanta, GA. U.S.A.
5. Feuillet, C., V. Lauvergeat, C. Deswarte, G. Pilate, A. Boudet, and J. Grima-Pettenati., 1995. Tissue and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. *Plant Mol. Biol.* 27 : 651-667.
 6. Fobert, P., and B. Lyer VN. 1991. Detection of gene regulatory signals in plants revealed by T-DNA-mediated fusions. *Plant Mol. Biol.* 17 : 837-851.
 7. Koncz C., N. Martini, R. Mayerhoffer, Z. Koncz-Kalnan, H. Korber, G. Redei, and J. Schell. 1989. High-frequency T-DNA mediated gene tagging in plants *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 8467-8471.
 8. Kwon, S.Y., J.R. Liu, J.J. Kim, and H.O. Park. 1996. A low-priced DNA delivery system using microprojectiles for plant cell transformation. *Kor. J. Plant Tissue Cul.* 23 : 51-54.
 9. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning : A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York. pp395.
 10. Michael, A.I., D.H. Gelfand, and J.J. Sninsky. 1990. *PCR Protocols.* Academic Press. San Diego, U.S.A. pp.482.
 11. Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
 12. Park, Y.S., J.M. Kwak, O.Y. Kwon, Y.S. Kim, D.S. Lee, M.J. Cho, H.H. Lee, and H.G. Nam. 1993. Generation of expressed sequence tags of random root cDNA clones of *Brassica napus* by single-run partial sequencing. *Plant Physiol.* 103 : 359-370.
 13. Philippe, V., K. Noel, M. Jesus, R. Carl, N. Cheri, and J.F. John. 1993. Development of the Particle Inflow Gun. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33 : 237-246.
 14. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463.
 15. Scott, R., J. Draper, R. Jefferson, G. Dury, and L. Jacob. 1988. Analysis of gene organization and expression in plants. *In* J. Draper, R. Scott, P. Armitage, and R. Walden eds. *Plant Genetic Transformation and gene Expression.* Blackwell. Sci. Pub.
 16. Topping J.F., F. Agyeman, B. Henricot, and K. Lindsey. 1994. Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* promoter trapping. *Plant J.* 5 : 895-903.
 17. Van Doorselaere, J., M. Baucher, C. Feuillet, A.M. Boudet, M. Van Montagu, and D. Inze. 1995. Isolation of cinnamyl alcohol dehydrogenase cDNAs from two important economic species : alfalfa and poplar. Demonstration of a high homology of the gene within angiosperms. *Plant Physiol. Biochem.* 33 : 105-109.
 18. Williams, J.F. 1989. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Biotech.* 7 : 762-768.