

Nodule 培養方法을 利用한 雜種포플러의 植物體 再分化^{1*}

鄭慶鎬² · 全瑛宇²

Plant Regeneration of Hybrid Poplars Through Nodule Culture System^{1*}

Kyung Ho Chung² and Young Woo Chun²

要 約

Nodule 培養 方法을 利用하여 雜種 포플러 양황철62-9와 이태리포플러 1호 Eco 28의 보다 進歩된 再分化 方法과 體細胞 胚 發生 方法을 얻었다. 칼루스는 2,4-D가 0.5, 2.0mg/1씩 添加된 培地上에 잎 組織을 置床하여 얻었고, 發達한 칼루스 組織을 液體 培地로 옮겨 細胞 懸탁 배양으로 세포를 增殖했다. 懸탁세포로부터 適當한 生長 調節物質을 添加하여 nodule을 生産했다. 액체 배지에서 直接 줄기를 再分化하는 試圖는 양황철에서만 可能했다. Agar 培地에 再分化用 生長調節 物質을 添加한 경우 상당히 많은 數의 줄기 分化가 분화 되었고, 몇몇 배지에서는 體細胞 胚로 분화 했다. 이러한 nodule 배양 방법은 苗木의 生産, 體細胞 變異의 利用, 二次 產物의 生産 그리고 그밖의 생물공학적 응용을 위한 조직 배양 재료로서 그 이용성에 대하여 考察했다.

ABSTRACT

Developmental micropropagation method and somatic embryogenesis for hybrid poplars, *Populus euramericana* Eco28, *P. nigra* X *P. maximowiczii* 62-9, were established using nodule culture system. Calli of Eco28 and 62-9 clone were initiated from leaf explant on the medium with 0.5mg/1 and 2.0mg/1 2,4-D, respectively. Cell suspension culture was established from callus derived from leaf explant culture. When suspended on MS medium with optimal combination of BA and NAA fine nodules were obtained after 2 weeks of culture. For shoot regeneration, nodules were transferred into liquid and agar solidified medium. Numerous shoots were regenerated from nodules of 62-9 on liquid media. Organogenesis was effectively achieved on agar solidified regeneration media containing different concentrations of BA and adenine sulfate. Average numbers of 27 and 24 shoots per nodule were induced from 62-1 and Eco28 clones after 8 weeks of culture, respectively. In addition, somatic embryogenesis also occurred in the same regeneration medium. This procedure can be applied to vegetative propagation, utilization of somaclonal variation, production of secondary metabolite and materials of biotechnology research.

Key words : *Populus nigra* X *P. maximowiczii*, *P. euramericana*, Cell suspension, Nodule culture, Regeneration, Somatic embryogenesis.

¹ 接受 1990年 12月 10日 Received on December 10, 1990.

² 國民大學校 林業大學 College of Forestry, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea.

* 본 연구는 1989년 한국과학재단 연구비의 일부 지원에 의해 수행된 것임.

序 論

Nodule은 식물의 세포 배양에서 植物體 再分化 過程中 器官分化나 體細胞胚 形成 과정에서 발생되는 特異한 형태의 세포 結集體로서, vascularized nodule (Halperin, 1966, 1970, 1986; Sharp 등, 1980), nubbins (Krikorian 등, 1981), nodular callus (Chatwvedi와 Mitra, 1975), meristematic tissue (Aitken-Christie 등, 1988) 등으로 불리어 왔고, 近來에 McCown 등 (1988)에 의해 모플러의 세포배양에서 그 형태와 이용성이 정리된바 있다.

임목의 形質 改良에 있어서 生物工學的 方法을 適用하는데는 林木이 가진 체반 생리적特性 때문에 問題가 되어 왔고 草本類에 比하여 全形成能 (totipotency)이 낮아 細胞나 組織으로 부터 식물체 재분화나 특히 體細胞胚 발생은 극히 소수의 樹種에 限定된 것으로 알려져 왔다 (Riemenschneider 등, 1988; Ledig와 Sederoff, 1985; Gupta와 Durzan, 1985, 1986; Haissig 등, 1987; Chun 등, 1988).

Nodule의 형성과 재분화 과정의 定立은 現탁 배양 방법의 長點과 새로운 培養試料의 이용으로 임목의 생물공학적 接近에 妨害가 되고 있는 문제들, 즉 幼令化(rejuvenation)의 難易性, 全形成能의 부족등의 문제점 解決에 상당한 도움이 될 것으로 생각되며 용이한 재분화 방법, 大量增殖의 自動化, 有用物質 器內生産 등 그 이용도가 넓어질 것으로 기대된다 (McCown 등, 1988).

本 研究에서는 우리나라의 主要 經濟樹種으로 보급 되고 있는 양황철과 이태리포플러1호를 對象으로 nodule의 생산 과정과 생산된 nodule로부터 器官 발생을 유도하고 體細胞胚 발생 과정을 유도하여 식물체 재분화 능력에 관하여 조사 하는데 목적을 두었다.

材料 및 方法

供試 材料는 林木 育種 研究所에서 開發 普及하고 있는 양황철나무 62-9클론과 이태리포플러 1호 Eco28 클론을 器內에서 1年 이상 繼代 배양 해온

것으로 BA (6-benzyladenine) 0.2mg/l을 첨가한 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 배지상에서 4주 동안 성장시킨 식물체를 시료로 이용했다. 형태를 완전하게 갖춘 2-3엽을 채취하여 소독된 칼로 상처를 주고 양황철은 0.5mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 이태리포플러 1호는 2.0 mg/l의 2,4-D가 첨가된 MS배지에 배양하여 3주 후 성장상태가 좋은 callus를 얻었다 (Plate 1).

2,4-D를 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0mg/l의 농도로 첨가한 MS 액체배지가 80ml씩 들어 있는 200 ml flask에서 200 xg의 속도로 이들 callus를 현탁 배양했고, 7일 간격으로 같은종류의 배지를 1/2씩 교환했다. 현탁배양후 2주와 4주 그리고 6주째 성장 세포의 농도를 조사했다. 배양실은 25±2°C 온도에 16/8 시간 光/暗 조건으로 실험기간 동안 균일하게 조절했다. 6주후 세포 현탁액을 BA와 NAA (α -naphthaleneacetic acid)가 농도별로 조합된 20종류의 액체 배지로 옮겨 nodule의 생산성을 비교했다. 세포의 성장과 nodule의 생산성 비교는 한 처리당 5개의 flask로 하여 2회 반복 실험했다.

Nodule로 성숙된 시료는 액체 배지에서 직접 식물체로 재분화 시키거나 agar 배지로 옮겨 기관 분화를 시도했다. 액체배지에서 직접 재분화시키는 과정은 40종류의 배지를 250ml flask에 80 ml씩 넣고 완전한 모양의 nodule을 100개씩 넣어 3반복으로하여 실험했다. 또한 agar배지에서의 재분화는 지름 10cm 의 1회용 petri dish에 25가지 조합의 성장조절물질이 함유된 배지를 25ml씩 넣고 10개씩의 완전한 모양의 nodule을 치상하여 10반복으로 실험했다. 각각의 액체배지와 agar 배지에서 배양 8주후 발생된 줄기와 체세포배를 조사했다.

結果 및 考察

1. 현탁 배양에 의한 세포 增殖

일 組織에서 유기된 callus를 이용하여 현탁배양 하였을때, 적당한 濃度의 2,4-D가 添加된 배지에서 callus는 단리된 세포 상태로 혹은 몇개의 세포 덩어리 상태로 분열하기 시작해 1주내로 액체 배지 상에서 3배 이상의 密度로 증식되어 졌다

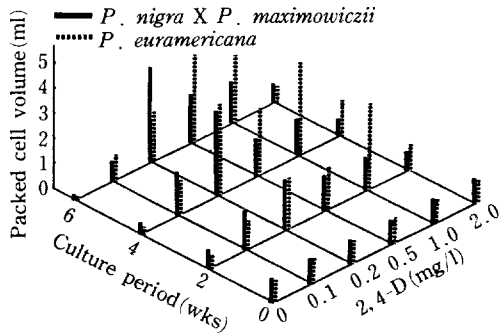


Fig. 1. Effects of 2,4-D and culture period on packed cell volume in 20ml cell suspension culture.

(Fig. 1, Plate 2). 두 樹種 모두 callus유도 배지보다 낮은 濃度의 2,4-D를 添加한 배지에서 生長이 좋았고, 양황철의 경우 2,4-D 0.2mg/l와 이태리포플러는 2,4-D 0.5mg/l 농도에서 가장 좋은 生長을 보였다. McCown 등(1988)은 nodule을 生産 하는데 짧은 期間 동안 auxin 배지에서 現탁배양하는 方法을 제시하고 있으나 보다 많은 세포의 分열을 유도하기 위하여 본 실험에서는 1주일 마다 같은 배지로 繼代 培養하면서 증식해도 nodule의 生産이나 식물체 재분화가 무리없이 進行 되었다. 이러한 細胞增殖 과정은 nodule의 연속적인 生産 체계에서 필요한 과정이 될것으로 사료된다. 일반적으로 세포현탁 배양은 生長 조절 물질의 種類의 濃度, 배양시간 등에 영향을 받는 것으로 알려져 왔다(Park 과 Son, 1988b). 본 실험에서는 生長 조절물질의 농도만 조절했는데 두종의 포플러 clone間에 상당한 차이를 보였고, 8주이상 제대배양 하면서 배양해도 세포의 生長이 안정된 상태로 계속되었으며 이후의 실험인 nodule의 生産이나 재분화를 무리없이 進行 할 수 있었다.

2. Nodule의 生成과 발달

生長이 왕성한 상태의 세포를 각각의 농도로 cytokinin이 첨가된 液體 培地로 옮겼을때 세포의 덩어리가 커지고(Plate 3), 1주가 경과 하면서 nodule로 發達했다(Plate 4A). 그후 1주일내에 그수가 많아지고 直徑이 1-2mm 정도로 커졌다(Plate 4B, C). BA와 NAA가 각각 다른 농도로 첨가된 액체배지에서 nodule의 生産性은 Fig. 2

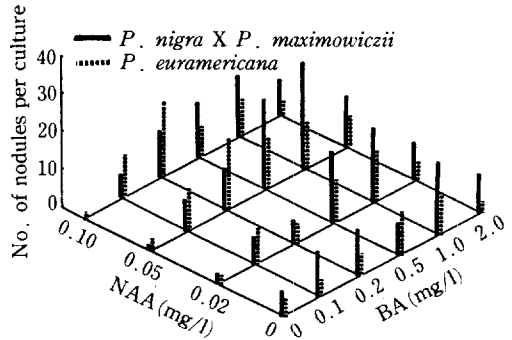


Fig. 2. Effects of BA and NAA on the nodule formation in liquid culture.

와 같다. 이태리 포플러의 경우 BA 0.2mg/l와 NAA 0.5-1.0mg/l이 첨가된 배지에서 優良한 nodule의 生成과 발달을 나타내었다. 양황철의 경우는 BA 농도가 보다 높은 0.5-1.0mg/l, NAA는 比較的 낮은 0.02-0.05mg/l의 농도에서 20개 이상의 nodule 生成과 발달을 보였다. 이는 이미 발표된 nodule생산이나 다른 세포 배양 과정에서 報告된 結果와 비슷하다(McCown 등, 1988; Chatwved, 1975; Halperin, 1986). 生産된 nodule의 特性은 再分化的 가능성이 높은 綠色의 반점을 가지며, 표면의 細胞 分裂이 抑制되어 있었다(Plate 5). 成長한 nodule은 연황색 혹은 아주 연한 녹색을 띠었다.

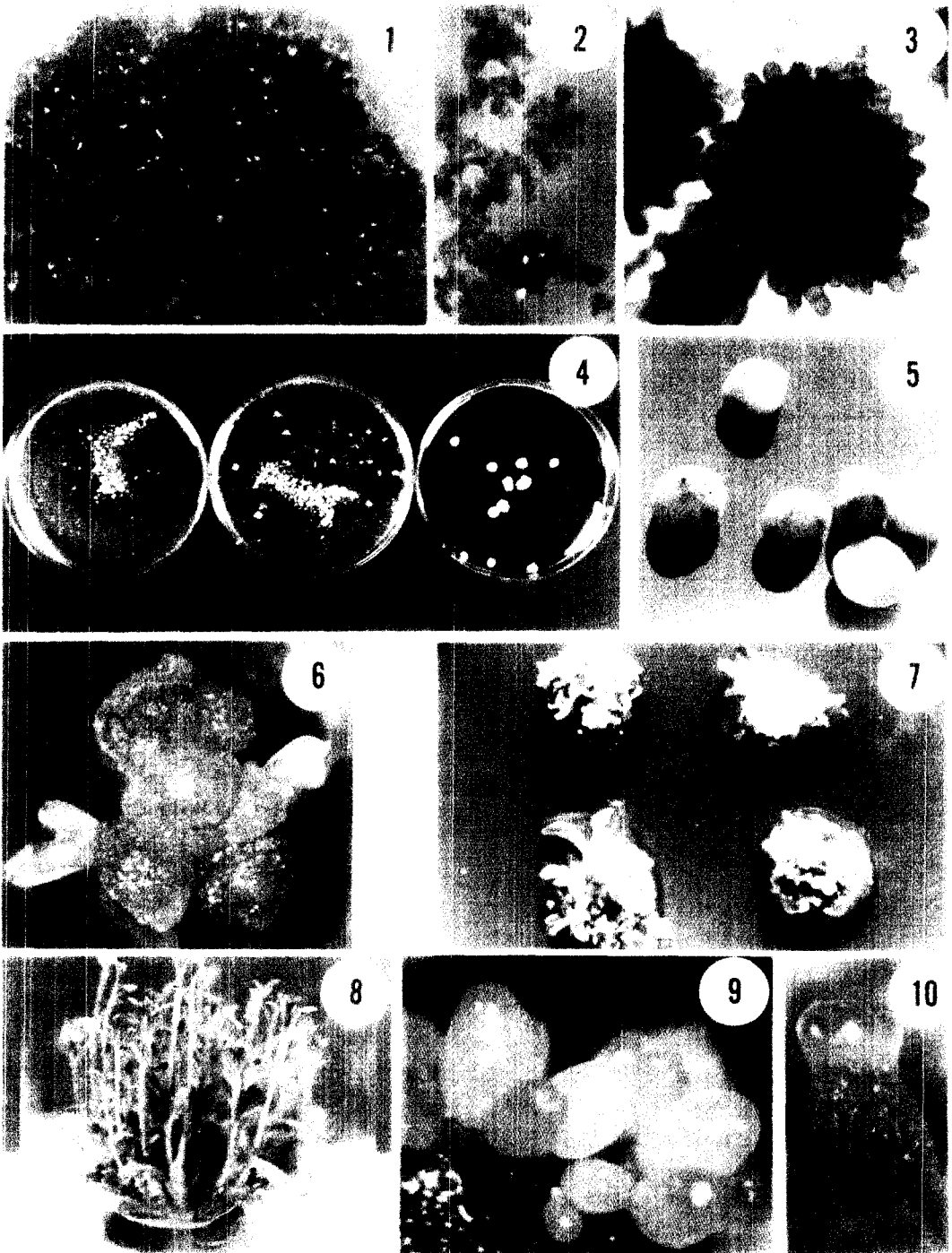
이러한 상태의 nodule은 본실험에서 이용한 재분화과정 이외에 또다른 목적으로의 응용방법이 계속 연구 되었을 때 폭넓은 이용 부분이 생길 것으로 期待 된다.

3. Nodule의 재분화

①液體 培地와 agar 배지로 부터 줄기 分化

양황철과 이태리포플러 nodule은 生長 조절 물질의 적절한 농도조절에 의해서 직접 액체 배지에서 줄기를 분화했다(Plate 6). 이는 다른 초본류나 木本 植物에서 그 事例가 찾아보기 어려운 과정이며 McCown 등(1988)의 경우 thidiazuron의 첨가로 포플러 nodule로부터 액체배지 상태에서 小數(6-9%)의 줄기 분화 가능성을 보고했다. Table 1에서 보는 바와같이 본 연구에서 액체 배지에서 직접 줄기를 분화 시키는 과정은 thidiazuron의 첨가없이 상당한 비율로 얻어질수 있었

PLATE 1-10



- Plate 1.** Friable callus derived from leaf explant of *P. nigra* X *P. maximowiczii* 62-9 clone on MS medium with 2,4-D 0.5mg/l.
- Plate 2.** Cell colonies of *P. nigra* X *P. maximowiczii* from actively growing suspension culture.
- Plate 3.** Cell colony of *P. euramericana* Eco28 clone from suspension cultures in the MS liquid medium with BA 0.2 and NAA 0.1mg/l after 1 week of culture.
- Plate 4.** Various developmental stages of nodule formation of 62-9 clone.
 - A. Nodule initiation after 7 days of culture.
 - B. Nodule development after 10 days of culture.
 - C. Nodule development after 14 days of culture.
- Plate 5.** Completely developed nodules of *P. nigra* X *P. maximowiczii* after 2-3 weeks of culture.
- Plate 6.** Direct shoot differentiation from nodules of 62-9 clone in liquid medium (MS+BA 1.0 mg/l).
- Plate 7.** Multiple shoots formation from nodules of Eco28 clone on the agar medium (MS+BA 1.0 mg/l+ adenine sulfate 20 mg/l) after 2 weeks of nodule culture.
- Plate 8.** Well developed shoot cluster of 62-9 clone.
- Plate 9.** A group of somatic embryos of 62-9 clone in a loose contact with nodule surface.
- Plate 10.** Somatic embryo development from 62-9 nodule on hormone free medium.

다. 그러나 아직도 그 과정이 불안정하고 BA와 조합으로 쓴 adenine sulfate, casein hydrolysate, 그리고 NAA 어느 곳에서도 특정한 효과없이 재분화율이 낮기 때문에 상당한 실험의 결과가 축적 되어야 할 것으로 사료된다. 만약 이들 실험 과정에 대한 연구들이 축적되어 보다 많은수의 재분화된 줄기나 체세포배들이 직접 액체 배지에서 얻어질수 있다면 기내에서 식물체를 재분화시켜 대량증식이나 체세포 변이체 이용 등에 아주 有用 할 것으로 사료된다.

한편 完全히 발달된 nodule을 agar 배지로 옮겨 재분화 시킬 경우 아주 많은 수의 줄기가 재분화 되었고, 생장조절 물질의 適用 範圍도 넓었다 (Fig. 2). 재분화 배지에 치상한 후 10일이 경과 하건서 nodule의 표면으로부터 다수의 줄기가 발생하기 시작했고, 3주째 부터 완전한 줄기의 형태를 보였다(Plate 7). 그후 같은 종류의 培地로 繼代培養하여 3주째는 3cm이상의 줄기로 발달했다 (Plate 8). 그러나 발달한 줄기의 數는 이태리 프플러 보다 양황철이 많았다. 재분화되는 줄기의 수는 cytokinine(BA)의 농도에 특히 敏感하게 반

응 했는데, 1.0mg/l의 농도에서 가장 많은 발생율을 보이다가 2.0mg/l부터 減少했다. 이러한 결과는 Douglas(1982)가 교잡 프플러 TT32의 세포 현탁 배양으로 부터 얻은 nodule 형태의 직경 2-4 mm cell colony에서 식물체를 재분화 시키는데 얻은 결과와 같다. Adenine sulfate는 20mg/l 이상부터 再分化 되는 줄기의 數에 영향을 미쳤다. 현재까지의 연구에 의하면 adenine sulfate는 auxin과 拮抗作用(antagonism)을 하여 줄기 再分化에 作用하는 것으로 보고 되어왔고(Miller와 Skoog, 1953), 器官이나 組織 그리고 callus에서 재분화 촉진 효과가 증명 되었다(Ahuja, 1986). 本 實驗에서도 callus의 유기와 세포 현탁배양 과정에 첨가된 auxin과의 拮抗作用을 함으로서 줄기 분화를 촉진 시킬 목적으로 adenine sulfate를 이용했다. 따라서 양황철 nodule을 MS agar배지 상에서 재분화 시키는데는 生長 調節物質로 BA 1.0mg/l와 adenine sulfate 50mg/l을 첨가 했을 때, nodule 한개당 26.9±6.4개로 가장 많은 發生率을 보였고, 이태리프플러의 경우 BA 1.0mg/l와 adenine sulfate 20mg/l에서 가장좋은 반응을

Table 1. Direct shoot regeneration from nodule culture of *P. nigra* X *P. maximowiczii* on liquid medium (Unit : Mean number of shoots per nodule).

	Adenine Sulfate (mg/l)	Casein Hydrolysate (mg/l)			NAA (mg/l)				
		0	20	50	100	500	0.05	0.1	0.5
	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0
BA (mg/l)	0.2	0	0	0	2.1	1.9	0	0.9	0
	0.5	1.4	0	0	1.3	1.8	0	0	0
	1.0	2.1	1.1	0	2.0	1.0	0	0	0
	2.0	0.1	1.2	0.4	1.2	0.5	0	0	0

Table 2. Effects of BA and adenine sulfate on the shoot regeneration from nodule on agar solidified medium after 8 weeks of culture.

BA (mg/l)	Adenine Sulfate (mg/l)									
	0		10		20		50		100	
	62-9*	Eco28*	62-9	Eco28	62-9	Eco28	62-9	Eco28	62-9	Eco28
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.2	3.1±0.9	0	2.1±1.4	0	7.3±2.1	0.9±1.2	4.6±2.3	0	3.1±2.4	0
0.5	9.6±2.4	1.2±0.8	11.2±4.8	1.3±0.8	11.0±3.6	5.4±1.6	5.4±4.3	0.7±1.2	3.0±0.8	1.9±1.2
1.0	12.3±3.7	7.6±2.2	11.6±2.2	6.9±2.1	17.4±5.4	14.0±2.7	26.9±6.4	10.6±4.2	16.8±4.7	14.4±3.3
2.0	10.5±5.2	9.8±3.3	7.5±2.1	10.5±3.1	15.9±4.3	20.7±6.3	23.5±7.9	24.4±5.8	10.4±3.7	19.8±5.1

P. nigra* X *P. maximowiczii* 62-9; *P. euramericana* Eco28.

Note: values represent mean ± S.E. of 10 replications.

보였다(Table 2). 앞서 遂行 되어진 포플러 組織 培養 實驗에서 器官이나 조직 그리고 callus로부터 植物體를 誘起하는데 cytokinin의 중요성이 언급된 바 있고 (Park과 Son, 1988b; Chalupa, 1974), 특히 Noh와 Minocha(1986)도 포플러 callus를 재분화 시키는데 cytokinin류 BA의 농도가 중요함을 확인 한바있다.

細胞 현탁 배양으로부터 완전한 식물체의 再生은 임목을 비롯한 高等植物의 우량형질 개체를 생물 공학적으로 이용 하는데 강력한 수단임은 이미 여러번 주장된 바 있다(Park과 Son, 1988b; Douglas, 1982). 그러나 일반적으로 임목에서 상당히 어려운 과정으로 알려져있고 (Durzan과 Lopushanski, 1975), 몇몇의 포플러 종에서 성공한 사례가 있는데(Park과 Son, 1988b; Cheema, 1989; Douglas, 1982), 본 연구 결과에 의하면 시포생장의 불안정성과 재분화 과정의 어려움을 극복하기 위해서는 nodule배양 방법이 상당한 유리점을 가질것으로 사료된다.

②體細胞 胚發生에 의한 再分化

器官分化的 다른 형태는 체세포 배의 형성인데 본 실험에 기관 분화방법으로 nodule을 agar배지에서 배양 했을때 多數의 體細胞 胚가 함께 형성 되었다(Plate 9). Nodule에 발생한 배는 줄기 발생 과정과는 다르게 一定한 단계 즉 魚雷型단계 이상으로 발달하지 않았고, 이 魚雷型 단계에서 그들 母組織인 nodule로부터 쉽게 分離되는 형태를 보였다(Plate 10). 그러나 배지를 옮겨 주었을 때 그 이상의 단계로 발달해 완전한 식물체가 되었다. 임목에서 체세포 배 형태의 기관발생은 몇 몇 樹種에서 報告된 바 있는데, 그 중 팔목할 만한 결과들은 Litz(1984)가 *Eugenia* 종에서 그리

고 Lakshmi Sita 등(1980)이 sandalwood에서 완전한 식물체를 얻은 경우와, 최근 Park과 Son (1988a)은 양황철의 잎조직에 物理的인 자극을 주어 포플러의 줄기 발생과 동시에 체세포배 형성을 보고했다. 또한 Cheema(1989)는 *Populus ciliata* 의 체세포배 형성을 보고한 바 있다. 그러나 아직도 체세포배 형성은 그 발생 빈도가 낮고 발생 기작을 정확하게 추적한 보고가 없어서 안정된 생산 체계나 그밖의 응용 연구가 불가능한 실정이다. 본 연구는 배양 재료가 부족한 임목에서 새로운 재료를 제시하고 그 재료로부터 체세포 배 발생 가능성을 제시 하는데 그 意義가 있다 하겠다.

結 論

Nodule培養 方法이 牙 培養이나 줄기 배양 등과 같은 既存의 林木 組織 培養에 比해서 多少의 생소함이 있는 것은 사실 이지만, 本 실험에서와 같이 상당한 再分化能을 나타냄 으로서 앞서 McCown 등(1988)에 의해 提示되었던 임목의 生物工學的 應用을 爲한 容易한 재분화 재료로서 높은 可能性을 가지며, 실제 體細胞 胚 형태로도 재분화됨으로 그 이용도를 보다 넓힐수 있을 것이다. 또한 daylily의 배양에서 나타난 nodule의 형태인 "nubbins"(Krikorian 등, 1986)의 경우에 의하면 nodule 배양법은 상당한 安定性을 가진 培養法으로 사료된다. Luckner와 Dietrich(1985)는 *Digitalis lanata*의 생산 可能性을 제시하고 있어 이용 範圍가 擴大될 可能性이 더욱 높아지고 있다.

그러나 아직도 실험된 사례가 적고 각 과정에서 나타날 결과가 변화될 요인이 많기 때문에 정확한 과정을 제시할 수 없으며, 또한 액체 배지에서 재

분화율이 낮고, 생리적 특성조사가 되어 있지 않다는점 등이 문제점으로 남아있다.

謝 辭

이 論文을 한국의 임목 조직배양 연구를 위해 헌신 하시다 作故하신 故 金在憲研究官님께 獻목합니다.

본 연구를 수행하는데 열성으로 실험을 도와준 국민대학교 산림자원학과 강범용군과 김미숙양에게 깊은 감사를 포함니다.

引 用 文 獻

1. Ahuja, M.R. 1986. Aspen. In : Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 4. Techniques and applications. D.A. Evans, W.R. Sharp, and P.J. Ammirato eds. Macmillan Pub. Com. New York, pp 626-651.
2. Aitken-Christie, J.A., P. Singh, and H. Davies. 1988. Multiplication of meristematic tissue : A new tissue culture system for radiata pine. In : Genetic Manipulation of Woody Plant. J.W. Hanover, and D.E. Keathley eds. Plenum Press, New York, pp413-432.
3. Chatwvedi, H.C. and G.C. Mitra. 1975. A shift in morphogenetic pattern in Citrus callus tissue during prolonged culture . Ann . Bot . 39 : 683-687.
4. Chalupa, V. 1974. Control of root and shoot formation and production of trees from poplar callus. Biol. Planta. 16 : 316-320.
5. Cheema, G.S. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension and tissue cultures of mature himalayan poplar (*Populus ciliata*). Plant Cell Report 8 : 124-127.
6. Chun, Y.W., N.B. Klopfenstein, H.S. McNabb, Jro, and R.B. Hall. 1988. Biotechnological applications in *Populus* species. J. Kor. For. Soc. 77 : 467-483.
7. Douglas, G.C. 1982. Protoplast isolation from totipotent cell cultures of *Populus* hybrid TT32. In : Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. pp. 605-606.
8. Gupta, P.K. and D.J. Durzan. 1985. Shoot multiplication from mature tree of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 4 : 177-179.
9. Gupta, P.K. and D.J. Durzan. 1986. Isolation and cell regeneration of protoplasts from sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 5 : 346-348.
10. Haissig, B.E., N.D. Nelson, and G.H. Kidd. 1987. Trends in the use of tissue culture in forest improvement. Bio/Technology 5 : 52-59.
11. Halperin, H.W. 1986. Attainment and retention of morphogenetic capacity *in vitro*. In : Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 3. Plant Regeneration and Genetic Variability, I. K. Vasil, ed. Academic Press. Inc., New York, pp3-47.
12. Halperin, H.W. 1970. Embryos from somatic plant cells. In : Control Mechanisms in the Expression of Cellular Phenotypes, H. Padykula et al., eds. Academic Press, Inc., New York, pp169-191.
13. Halperin, H.W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. Ame. J. Bot. 53 : 443-453.
14. Krikorian, A.D., S.A. Staicu, and R.P. Kann. 1981. Karyotype analysis of a daylily clone reared from aseptically cultured tissues. Ann. Bot. 47 : 121-131.
15. Lakshmi Sita G., N.V. Raghava Ram, and C.S. Vaidyanathan. 1980. Differentiation of embryoids and plantlets from shoot callus of sandalwood by experimental embryogenesis. Plant Sci Letter. 20 : 63-69.
16. Ledig F.T. and R.R. Sederoff. 1985. Genetic engineering in forest trees. In : Proceedings of the 18th Southern Forest Tree Improvement Conference, May 21-25, Long Beach, MS. pp4-13.
17. Litz R. E. 1984. *In vitro* responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. HortSci. 19 : 720-722.
18. Luckner, M. and B. Diettrich. 1985. Formation of cardenolides in cell and organ cultures of *Digitalis lanata*. In : Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures, D. Neumann,

- et al., eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp154-163.
19. McCown B.H., E.L. Zeldin, H.A. Pinkalla, and R.R. Dedolph, 1988. Nodule culture : A developmental pathway with high potential for regeneration, automated micropropagation, and plant metabolite production from woody plants. In : Genetic Manipulation of Woody Plant, J.W. Haniver, and D.E. Keathley, eds. Plenum Press, New York, pp149-166.
 20. Miller, C. and F. Skoog. 1953. Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *Ame. J. Bot.* 40 : 768-773.
 21. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473-479.
 22. Noh, E.W. and S.C. Minocha. 1986. High efficiency shoot regeneration from callus of quaking aspen (*Populus tremuloides* M.). *Plant Cell Report* 5 : 464-467.
 23. Park, Y.G. and S.H. Son. 1988a. Regeneration of plantlets from cell suspension culture derived callus of white poplar (*Populus alba* L.). *Plant Cell Report* 7 : 567-570.
 24. Park, Y.G. and S.H. Son. 1988b. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* X *P. maximowiczii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15 : 95-105.
 25. Riemenscheider, D.E., B.E. Haissig, and E.T. Bingham. 1988. Integrating biotechnology into woody plant breeding programs. In : Genetic manipulation of woody plant, J.W. Haniver, and D.E. Keathley, eds. Plenum Press, New York, pp433-449.
 26. Sharp, W.R., M.R. Sondahl, L.S. Caldas, and S.B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.* 2 : 268-310.