

Electroporation을 이용한 잔디(*Zoysia japonica* Steud.) 및 벼(*Oryza sativa* L.) 배발생세포로의 DNA 도입

박건환 · 최준수 · 윤충효¹ · 안병준*

단국대학교 농과대학 관상원에학과, ¹농촌진흥청 농업유전공학연구소

DNA Delivery into Embryogenic Cells of Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) and Rice (*Oryza sativa* L.) by Electroporation

Gun Hwan PARK, Joon Soo CHOI, Choong Hyo YUN¹, and Byung Joon AHN*

Department of Ornamental Horticulture, Dankook University, Choeran
Choongnam 330-714; and ¹Agricultural Biotechnology Institute, RDA, Suwon, 440-707. *Corresponding author.

To develop simple and efficient transformation methods of monocotyledonous plants, electroporation-mediated delivery of DNA into intact embryogenic cell clumps was investigated in zoysiagrass and rice. Calli of zoysiagrass, induced from 3-week-old immature embryos, were suspension-cultured in MS basic medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D and used for electroporation. Calli, derived from immature inflorescences of 20 mm in length of rice, were also suspension-cultured on N₆ basic medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D. Suspension-cultured embryogenic cell clumps were electroporated in liquid MS medium added with a plasmid DNA (30 µg/mL), pGA1074, encoding β-glucuronidase (GUS). DNA delivery into the cells through cell walls and cell membrane was confirmed by the transient expression of the GUS gene. Cell clumps of zoysiagrass and rice, electroporated with 400 volt at 800 µF capacitance, expressed GUS gene activity at a mean frequency of 25 units (one unit = one colony of blue cells) per 200 µl of packed cell volume. Untreated cells and treated non-embryogenic cells did not exhibit GUS activity. These results indicate that electroporation-mediated transformation can use intact embryogenic cells (thus avoiding the use protoplasts) in zoysiagrass and rice.

Key words: β-glucuronidase, transient transformation

유용 유전자를 작물에 도입하기 위해서는 효율적인 형질 전환 방법이 작물에 따라 개발되어야 한다. 쌍자엽 식물에서는 보편적인 T-DNA를 이용한 형질전환 방법이 단자엽 식물에서는 벼와 옥수수 등의 일부에서 극히 제한된 이용 결과가 보고되고 있는 실정이다(Chan et al., 1992; Denson et al., 1988). 단자엽 식물의 경우, 원형질체를 이용한 electroporation이나 microinjection에 의한 형질전환 방법이 주로 이용되었으며, 현재는 식물 조직을 직접 형질전환 하는 particle bombardment 기술의 이용이 증가하고 있는 추세이다. 그러나 이 기술도 chimera 식물이 나타나거나 안정적 유전자 전입의 효율이 아직은 낮아 기술의 적정화가 필요한 실정이다.

세포에 DNA를 직접 도입하는 electroporation 방법은 식물

에서는 1983년부터 시도되기 시작하여 벼에서는 형질전환된 식물체까지 얻어진 바 있다(Shillito et al., 1985). 식물의 electroporation은 원형질체를 대상으로 하게 되는데, 원형질체의 분리 및 배양 자체가 어려워 벼나 옥수수 일부 품종을 제외한 단자엽 식물의 형질전환 기술 체계가 확립되지 못한 실정이다. 원형질체 대신에 세포벽을 제거하지 않은 캘러스 세포에 DNA를 미세주사(microinjection) 하거나 분화된 조직 또는 식물의 화기에 DNA를 직접 처리하는 macroinjection을 이용한 형질전환 연구 결과가 보고되고 있으나, 아직까지 일반화되지는 않고 있다(Neuhaus et al., 1987; de la Pena et al., 1987).

단자엽 식물을 조직배양하여 나타나는 체세포배발생 세포는 세포질이 풍부하고 mucopolysaccharide와 같은 점액성

물질이 덜 축적되거나 이차세포벽이 덜 발달하여 DNA와 같은 거대분자가 세포벽을 통해 도입될 수 있을 것이라고 생각되어진다(Ahn et al., 1988). 실제로 배 발생 세포를 electroporation하여 옥수수를 형질전환 시킨 결과가 보고된 바 있으며, 건조된 종자의 재습윤 과정에서 세포벽을 통해서도 외부 유전자가 배조직 세포내로 전이된 예를 보더라도 배조직 세포의 세포벽이 거대분자가 침투할 수 있는 특성을 가졌음을 시사하고 있다(Reinhard et al., 1989; D'Halluin et al., 1992).

본 실험은 기내 배양중인 벼와 잔디의 세포를 electroporation하여 외래 유전자를 배발생세포의 세포벽과 세포막을 통해서 DNA의 도입 가능성을 확인하기 위해 실시되었다.

재료 및 방법

잔디, 벼의 배발생캘러스 유도 및 식물체 재분화

들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)를 생장상(4 × 40 watt cool white 형광등 인조 조명, 14시간 일장, 27°C)에서 재배하며 인공수분하여 4주 후 채취한 미숙종자를 70% ethyl alcohol에서 1분 0.5% 차아염소산나트륨 용액에서 10분간 소독한 후 미숙배를 절취하여 절편체로 이용하였다. 이들을 sucrose 30 g/L, Phytigel (Sigma Co., USA) 3 g/L, 2,4-D가 2 mg/L 함유된 MS 고체 배지에 치상하여 배발생 캘러스를 유도 하였다. 유도된 캘러스 중 단단하며 구상의 배발생 캘러스를 선별하여 30 g/L sorbitol, 10 g/L sucrose, 12 mM proline, 100 mg/L tryptone, 5 mM MES (pH 5.8), 1 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 액체배지에 옮겨 회전진탕(100 rpm) 배양하였다. 계대배양은 배지의 4/5를 동일한 양의 새 배지로 교체하며, 매 7일 마다 실시하였다.

벼는 포장 재배한 낙동벼(*Oriza sativa* L. cv Nakdong)에서 길이 30 mm 이하의 유수가 형성되고 있는 줄기를 채취하여 잔디와 같은 방법으로 표면 살균한 한 다음 미숙화서를 절취하여 배양하였다. 사용된 배지는 sucrose 30 g/L, Phytigel (Sigma Co., USA) 3 g/L, 2,4-D가 2 mg/L 함유된 N6 고체배지를 이용하였다. 두 식물의 캘러스 배양과 세포 현탁배양은 10시간 일장(2000 lux, 2 × 40 watt cw 형광등)과 25°C로 조절된 항온실에서 이루어졌다. 유도된 배발생캘러스를 2,4-D가 1 mg/L 함유된 N6 액체 배지에 옮겨서 진탕 배양하였다.

Plasmid DNA

형질전환 실험의 표지 유전자로 GUS 유전자를 이용하였다. pGA1074는 CaMV 35S promoter에 의해 조절되는 GUS

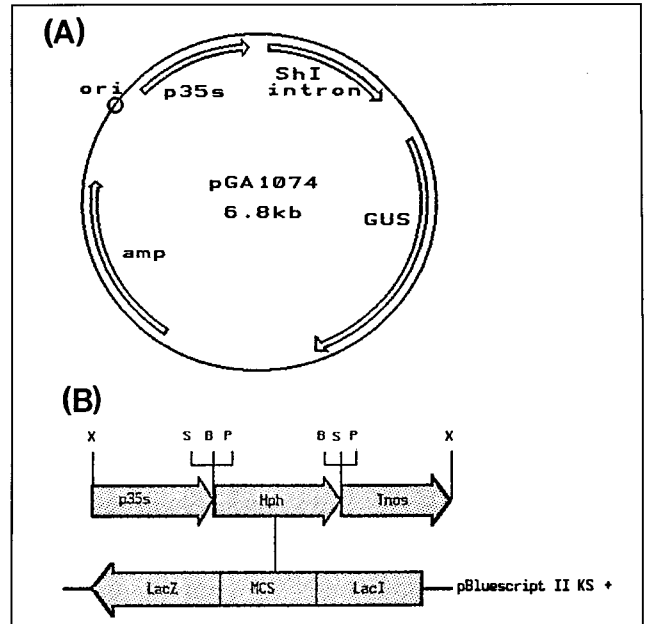


Figure 1. Diagrams of (A) plasmid pGA1074 and (B) pGA1139. X=XbaI, S=Sall, B=BamHI, P=PstI.

유전자, ShI intron, NOS-poly A signal과 함께 ampicillin 저항성 유전자를 포함하는 GUS 발현 운반체이며(Figure 1A), hygromycin 저항성을 선발 표지 유전자로 사용할 수 있는 pGA1139는 CaMV 35S promoter, hygromycin 저항성 유전자, NOS-poly A signal 유전자를 포함하고 있다 (Figure 1B). 이들 plasmid는 안진홍 박사(Washington State University, Pullman, WA)로부터 제공되었다. Sambrook (1989) 등의 방법을 이용하여 이 plasmid를 증식하였고 sodium dodecyl sulfate (SDS) 방법으로 분리 하였다. DNA 용액은 1 µg/µl의 농도로 멸균 증류수에 희석하여 사용하였다.

Electroporation 처리와 세포의 생명력

Electroporation 실험은 Cell-Porator System I (BRL, Gaithersburg, Mariland, USA)을 이용하였다. 전압과 capacitance 수준에 따른 세포의 생명력 상실 정도를 조사하기 위하여, 400 V의 전압에서 capacitance를 10, 50, 60, 330, 800, 1180, 1600, 1980 µF로 조절하며 전기 충격을 1회 주었다. 2,4-D가 0.5 mg/L 함유된 액체 MS배지에서 진탕 배양 중인 세포의 200 mg을 cuvette에 옮긴 후, pGA1074 DNA를 30 µg/ml 첨가한 액체 MS 배지를 넣어 최종 부피가 1 ml이 되도록 한 후 전기 충격을 주었다. 처리된 세포를 24 cell-well plate (Nunc, Denmark)에 옮긴 후 200 µl의 MS_{10D} 액체 배지를 첨가하여 28°C 암상태에서 24시간 배양하였다. 여기에 1% tetrazolium 800 µl를 첨가하고 48시간 후에 세포 환원력에 따른 tetrazolium 발색 반응을 조사하였다.

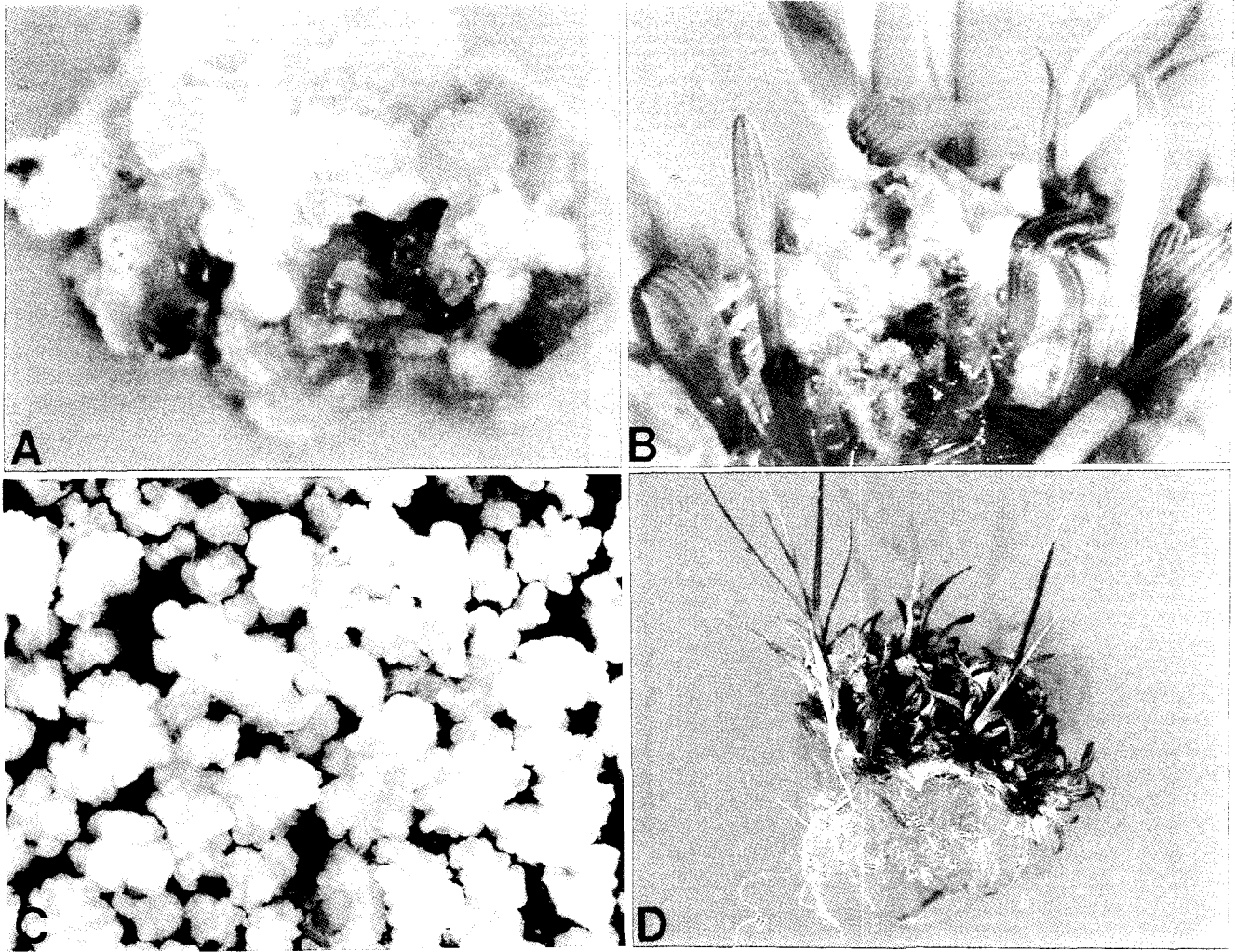


Figure 2. Embryogenic cultures. (A) Embryogenic callus and (B) regenerating callus of rice. (C) Liquid-cultured cell clumps and (D) regenerated plantlets of zoysiagrass.

GUS 표지 유전자를 이용한 세포로의 DNA 도입 확인

표지 DNA와 함께 electroporation 처리된 세포를 24-cell well plate에 옮겨서 28°C 암상태에서 24시간 배양 후 Jefferson 등(1987)의 방법을 따라 GUS 분석을 실시하였다. Cell plate에 세포괴를 옮기고 200 μ l의 GUS 반응용액 [1 mM X-Gluc, 0.1% DMSO, 0.1% Triton X-100, 100 mM phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM K⁺ ferricyanide, 0.5 mM K⁺ ferrocyanide]을 첨가 하였다. Cell plate를 28°C에서 48시간 배양한 후 GUS 유전자 발현에 따른 GUS 활성을 조사 하였다. 각 처리마다 DNA를 첨가하지 않고 pulse 처리만 한 것, DNA는 첨가하고 pulse는 주지 않은 대조구를 함께 비교하였다.

Electroporation 처리된 세포의 배양

GUS 발현 운반체인 pGA1074 와 hygromycin 저항성 유전자를 포함하는 pGA1139를 함께 첨가하여 electroporation cotransformation을 실시 하였으며, hygromycin이 첨가된 배지에서 형질전환된 세포들을 선발하고자 하였다. Electroporation 처리된 세포들을 24-cell well plate에 옮겨서 28°C, 암상태에서 48시간 배양한 다음, DNA가 포함된 전해질액을 제거하고 세포괴들을 멸균수로 3회 이상 세척하였다. 잔디 액체진탕 배양배지(계대배양 4일 후)와 새로 만든 액체배지를 각각 같은 양 씩 섞어서 여과멸균한 배지 10 ml을 250-ml 삼각 플라스크에 넣고 carbenicillin과 cefotaxime을 각각 200 mg/L씩 첨가한 다음, electroporation 처리된 세포들을 옮겨서 천천히 진탕배양(20 rpm) 하였다. 4주 후 이 액체배지에서 증식된 세포들을 hygromycin이 첨가된 배지에 옮겨 hygromycin 저항성 세포 선발을 시도하였다.

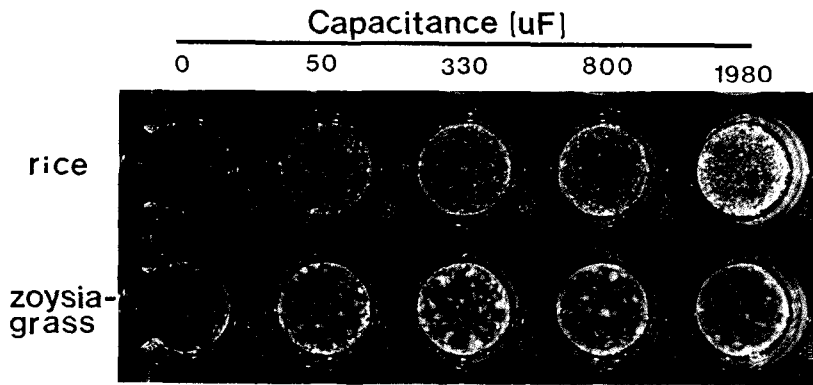


Figure 3. Viability tests of cell clumps electroporated at various capacitance levels using tetrazolium reducing reaction in (A) rice and (B) zoysiagrass. The cells stained red show their viable state.

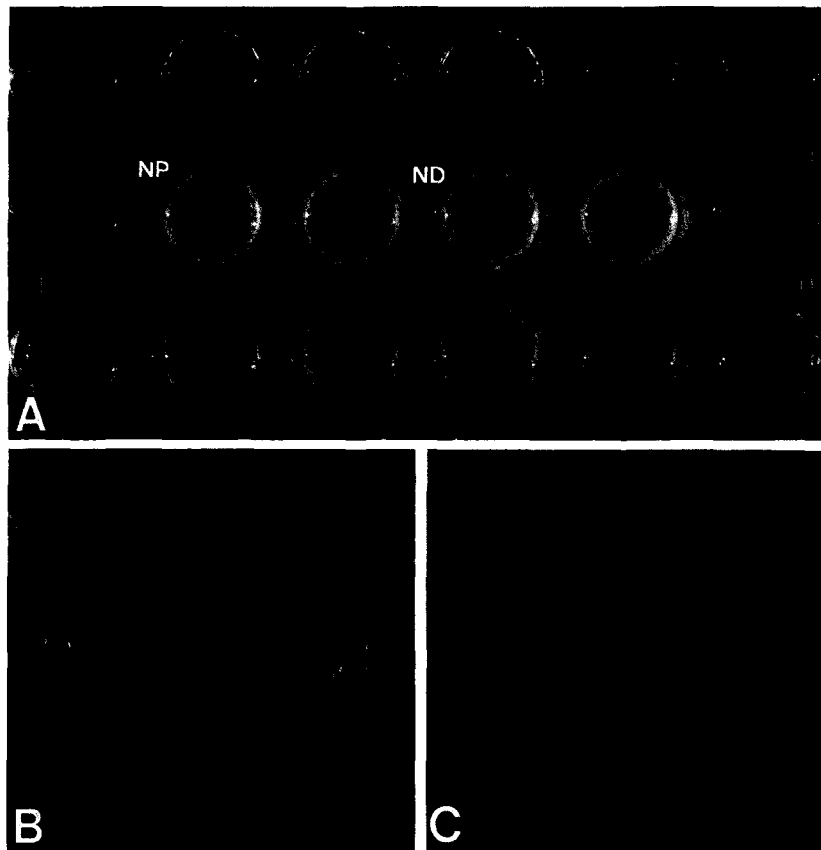


Figure 4. Electroporation of intact embryogenic cell clumps of zoysiagrass and rice. (A) Transient GUS gene expressions in cell clumps of rice electroporated with pGA1074, a GUS expression vector. Negative controls: np=no electric pulse but DNA added, nd=no DNA added but electric pulsed. (B) the close-up view of a cell wall. (C) An embryogenic cell clump showing a GUS unit (a colony of blue cells).

결과 및 고찰

잔디와 벼 배발생 캘러스 유도 및 식물 재분화

인공수분 후 3주된 잔디의 미숙배를 MS2.0 mg/L 2,4-D 배지에 치상한지 7일 후부터 일부 절편체에서 캘러스 형성이 관찰되었다. 총 44개의 절편체 중에서 4개의 캘러스만이 형성되어 낮은 캘러스 형성율을 나타내었다. 그러나 이 중 3개의 캘러스가 배발생 캘러스로 확인되어 미숙배가 잔디 배발생 배양에 효과적임을 알 수 있었다. 잔디의 배발생 캘러스는

회고 단단한 세포피 형태를 보였다(Figure 2A). 이들 세포피들은 2,4-D가 첨가되지 않은 MS 배지에 옮기면 2주 후부터 다수의 식물체로 재분화 되었다(Figure 2B).

길이가 30 mm 이하의 낙동벼 미숙화서를 2,4-D가 2 mg/L 함유된 N6 배지에 치상 하였을 때 4주 후에 모두 캘러스를 형성하였다. 대부분의 이들 캘러스들도 잔디에서와 같이 세포질이 풍부하고 단단하며, 배발생 캘러스에서 흔히 나타나는 갈색물질의 축적이 세포피 사이에서 관찰되었다(Figure 2C). 이들 캘러스들은 호르몬이 없는 N6 배지에 옮겼을 때, 거의 모든 캘러스에서 식물체가 재분화 되었으며,

NAA 1 mg/L, kinetin 5 mg/L가 포함된 N₆ 배지에서는 더 높은 재분화율을 나타내었다. 배발생 캘러스의 배발생 세포괴만을 선별하여 잔디는 2,4-D가 1 mg/L 함유된 MS_{1.0}D 배지에, 벼는 2,4-D가 1 mg/L 포함된 N_{1.0} mg/L 2,4-D 배지로 21 일마다 계대배양 하였다. 이들 세포주의 배발생 세포괴 (embryogenic cell clumps)들을 선별하여 잔디는 액체 MS_{1.0} mg/L 2,4-D 배지에서, 벼는 액체 N_{1.0} mg/L 2,4-D 배지로 옮겨 액체 진탕 배양하였다. 두 식물의 배발생 세포들은 직경 5 mm 정도의 집단화한 세포괴 상태로 증식하였다(Figure 2D). 세포괴들을 호르몬이 없는 고체배지에 옮겨놓을 때 4주 후부터 체세포배 형성과 함께 발아가 일어나기 시작하여 식물체로 재분화 시킬 수 있었다. 액체 진탕 배양기간이 30 주 이상 지속되면서 재분화율이 떨어지는 경향을 보였다 (data 미제시).

Electroporation 처리와 세포의 생명력

Electroporation 처리 시 DNA의 도입을 최대화 하면서도 세포의 생명력을 유지할 수 있는 capacitance 수준을 조사하였다. Electroporation된 세포의 활력은 살아있는 세포가 가진 환원력에 의한 tetrazolium 발색반응을 이용하였다. pulse 처리를 받지 않은 세포들은 tetrazolium을 환원시켜 모두 빨간색으로 변한 반면, electroporation 처리된 세포들은 capacitance 수준의 증가에 따라 생명력이 감소되었고, 800 μ F/400 V의 electric pulse에서 세포의 반 정도가 생명력을 잃는 것을 확인하였다(Figure 3). 본 연구에서는 세포괴의 절반이 치사할 때 DNA 전이 효율이 가장 높을 것으로 가정하여, 400 V의 전압과 800 μ F의 capacitance를 표준 electroporation 조건으로 설정하였다.

배발생 세포로의 DNA 도입에 따른 GUS 유전자 발현

GUS 발현 DNA 운반체인 pGA1074와 함께 pulse 처리한 벼의 세포괴를 24시간 배양하여 GUS 반응용액을 첨가하면, 24시간 후부터 GUS 유전자 발현에 따른 청색 세포군이 나타나기 시작하였으며, 48시간까지 발색 반응 정도가 계속 증가 하였다. 어떤 세포괴에서는 GUS 반응용액을 첨가하고 5 일이 지나서 발색반응이 나타나는 경우도 관찰되었다. 200 mg의 세포괴 중 GUS 유전자 발현부위(청색을 나타내는 독립된 세포군)가 평균적으로 25개 이상 나타났다(Figure 4A, 4B). 연구가 진행되어 electroporation 실험 조건이 개선 되어 감에 따라 DNA 전이 효율이 크게 향상되어 대부분의 세포괴에서 1개 이상의 GUS spot을 볼 수 있었다(Figure 4C). 전이 효율 향상에 따라 인접한 GUS 발현 단위(GUS unit, GUS 발현에 따라 푸른색을 나타내는 단위 세포군) 간에 구분이 명확하지 않고 경우에 따라서는 GUS 반응의 산물인 불용성 indigo 잉크의 번짐 현상에 따라 세포괴가 전체적

으로 청색을 나타내었다. 이와 같은 GUS 발현은 electroporation 처리된 잔디의 배발생세포괴에서도 유사한 효율로 일어남이 반복적으로 확인되었다. electric pulse를 주지 않았거나 pGA1074가 첨가되지 않은 세포괴에서는 GUS 발현이 관찰되지 않은 반면에 GUS 유전자가 포함된 pGA1074와 함께 electroporation된 배발생 세포에서 GUS 유전자 발현이 반복적으로 관찰됨으로써, DNA가 세포벽과 세포막을 통해 세포내로 전이하였음을 알 수 있었다. 따라서 단자엽 식물 electroporation 형질전환 실험시에 원형질체 대신에 배발생 세포가 이용될 수 있음이 입증되었다.

Electroporation 처리된 세포의 배양

GUS 유전자 운반체인 pGA1074와 hygromycin 저항성 유전자가 포함된 pGA1139를 함께 배발생 세포와 electroporation 한 다음, 2,4-D가 2 mg/L 함유된 액체배지에 옮겨 배양을 시도하였다. 세포괴들 일부가 액체배지에서 생장을 지속하였으며, 4주 후에 2,4-D가 1 mg/L 함유된 N₆ 고체배지에 옮겨놓을 때도 계속 증식을 하였다. 증식된 세포들을 hygromycin이 30 mg/L 첨가된 N₆ 고체배지에 옮겨서 배양하였으나 세포들은 갈변화와 함께 생장이 억제되었다. 식물 genome내로 표지 유전자가 재조합된 형질전환 캘러스나 식물체를 얻기 위해 electroporation 후의 배양 조건적정화에 노력하고 있다.

현재 단자엽 식물의 형질전환은 대부분 particle gun과 electroporation을 이용하고 있으며, electroporation에 의한 형질전환은 원형질체를 대상으로 DNA를 도입시키고 있다. 비록 몇 종의 단자엽식물에서 성공적인 형질전환이 보고된 바 있으나, 아직까지 electroporation 된 원형질체를 배양하는 것은 고도의 기술을 요하고 있어 국내에서는 단자엽 식물의 형질전환이 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 이는 원형질체를 분리하고 형질전환을 위해 조작하는 절차가 형질전환된 세포의 생육과 재분화를 억제하는 요인이 되고 있기 때문이다. 본 실험의 결과는 외래 DNA가 세포벽을 제거하지 않은 벼와 잔디의 배발생 세포내로 전이 될 수 있으며, 따라서 electroporation시 원형질체 대신에 intact한 세포가 사용될 수 있음을 보여 주었다. 그리고 형질전환된 세포 내의 세포들은 이웃한 세포들에 의해 nurse culture의 효과를 볼 수 있기 때문에 형질전환된 세포의 지속적 생장에 도움이 될 것이다. Transient gene expression이 일어난 원형질체로부터 목화에서는 0.7%, 담배에서 1.9%, 옥수수에서 5%의 효율로 stable transformation이 일어났다는 보고를 감안한다면, 본 실험에서 electroporation된 세포괴들로부터 stable transformation이 일어난 세포 및 식물체를 얻을 수 있는 가능성은 높다고 생각한다(Fineland McMullen, 1990; Klein, 1988; Spencer, 1990). 결론적으로 본 실험에서 외래 DNA를 배발생 세포와 함께 electroporation하면 세포벽과

세포막을 통해서 DNA가 도입되어 일시적으로 발현됨이 벼와 잔디 모두에서 확인되었다. 본 실험 방법은 벼와 잔디를 포함한 단자엽 식물에서 electroporation을 이용하여 배발생 세포에서 외래유전자의 transient 유전자 발현을 시도하거나 DNA를 직접 형질전환 하는 방법의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

적 요

간편하면서도 효율적인 단자엽 식물의 형질전환 기법을 개발하기 위하여 배발생 세포를 직접 electroporation하여 DNA를 도입하는 실험을 벼와 잔디에서 실시하였다. 잔디는 수정 후 3주된 미숙배에서 캘러스를 유도하였으며, 24-D가 1 mg/L 함유된 액체 MS배지로 옮겨 진탕배양한 것을 electroporation 실험에 이용하였다. 벼는 20 mm 정도의 미숙화서 유래의 캘러스를 액체 N6배지(1 mg/L 24-D 함유)에서 진탕배양하여 획득한 세포주를 사용하였다. 액체 진탕배양한 세포괴를 GUS expression vector인 pGA1074 (30 µg/ml)와 함께 MS 액체 배지에서 Electroporation하였다. 세포벽과 세포막을 통한 세포로의 DNA 전이는 GUS 유전자의 발현 여부 및 정도에 따라 결정하였다. 400 volt, 800 µF capacitance로 electroporation 처리된 벼와 잔디의 세포괴들은 200 µl (packed cell volume)의 세포괴 당 25 unit (1 unit = 파란색을 띠는 독립된 세포군) 이상의 빈도로 GUS 활성을 나타내었다. 반면에 무처리 세포주 및 처리한 비배발생 세포주에서는 GUS 발현이 일어나지 않음을 반복적으로 확인하였다. 따라서 electroporation에 의한 벼와 잔디의 형질전환 실험에서 원형질체 대신 intact한 배발생 세포가 이용될 수 있음을 의미한다.

사시 본 논문을 위해 pGA1074와 pGA1139 plasmid를 제공하여 준 안진홍 박사(Washington State University, Pullman, WA)에게 감사드린다.

인 용 문 헌

Ahn BJ, King JW, Huang FH (1988) Common bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]. In YPS Bajaj, ed, Biotechnology in Agriculture and Forestry 6: Crop II. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 458-469

Bates GW, Piastuch W, Riggs CD, Rabussay D (1988) Electroporation of DNA delivery into plant protoplasts. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 12: 213-18

Carls R, Birch RG (1992) Optimization of conditions for electroporation and transient expression of foreign genes in sugarcane protoplasts. *Plant Science* 81: 65-74

Chan MS, Lee TM, Chang HH (1992) Transformation of indica (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiol* 33(5): 577-583

de la Pena A, Lorz H, Schell J (1987) Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature* 325: 274-276

Donson J, Gunn HV, Woolston CJ, Pinner MS, Boulton MI, Mullineaux PM, Davies JW (1988) *Agrobacterium*-mediated infectivity of cloned Digitaria streak virus DNA. *Virology* 162: 248-250

Finer JJ, McMullen MD (1990) Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 8: 586-589

Guerche P, Bellini C, Le Moullec MJ, Caboche M (1987) Use of a transient expression assay for the optimization of direct gene transfer into tobacco mesophyll protoplasts by electroporation. *Biochimie* 69: 621-8

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 397-405

Klein TM, Harper EC, Svab Z, Sanford JC, Fromm ME, Maliga P (1988) Stable genetic transformation of intact Nicotiana cells by the particle bombardment process. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8502-8505

Neuhaus G, Spangenberg G, Scheid OM, Schweiger HG (1987) Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. *Theor Appl Genet* 75: 30-36

Potter H, Weir L, Leder P (1984) Enhancer-dependent expression of human K immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7161-7165

Reinhard T, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH (1989) Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. *Plant cell* 1: 133-139

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Sauders JA, Smith CR, Kaper JM (1989) Effects of electroporation pulse wave on the incorporation of viral RNA into tobacco protoplasts. *BioTechniques* 7: 1124-1131

Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Muller M, Potrykus I (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Technology* 3: 1099-1103

Spencer TM, Gordon-Kamm WJ, Daines RJ, Start WG, Lemaux PG (1990) Bialaphos selection of stable transformants from maize cell cultures. *Theor Appl Genet* 79: 625-631

(1994년 10월 22일 접수)