

Particle Inflow Gun을 이용한 벼 캘러스 내의 효율적 유전자 도입

송인자 · 배창휴 · 최대옥¹ · Ryo Akashi² · 이효연*

순천대학교 농과대학, ¹순천대학교 자연과학대학, ²미야자키대학교 농과대학

Efficient Gene Introduction into Rice Callus by Using Particle Inflow Gun System

SONG, In-Ja · BAE, Chang-Hyu · CHOI, Dae-Ock¹ · Ryo Akashi² · LEE, Hyo-Yeon

College of Agricultural & Life Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

¹College of National Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

²Division of Grassland and Animal Production, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki 889-21, Japan

ABSTRACT We have developed a homemade particle inflow gun (PIG) system which has simple operation method, low price and high gene introduction efficiency into rice callus. Rice callus were inflowed with gold particles containing DNA of a plasmid, pIG121Hm, harboring intron GUS (β -glucuronidase) gene, NPTII gene and HPT gene. For optimal GUS transient expression, the effects of parameters on DNA delivery efficiency of the PIG system was investigated by scoring transient GUS expression. The highest number of blue spots was observed at 16 mM of spermidine and 1.5 M of calcium chloride, respectively. And the amount of gold particles required for the best GUS expression was 2 mg. Optimum GUS transient expression was observed at target distance of 12 cm and helium pressure of 3.5 bar (50 psi). Gene introduction efficiency of the PIG system was observed almost similar to that of the Biolistic Gun (Bio-Rad Company). Since PIG system is simple to operate and one doesn't need disposable accessories, the PIG system can be easily applied to various replication experiments.

Key words: Calcium chloride, gold particles, helium pressure, shooting distance, spermidine

서 론

최근 *Arabidopsis*의 전 염기서열이 결정됨에 따라 기능 유전자에 대한 연구관심이 높아지고 있다. 따라서 세포내의 유전자 발현 및 형질전환 식물체 개발에 대한 중요성이 점차 강조되고 있는 실정이다. 이미 벼, 담배, 잔디를 포함한 대다수의 작물에서 형질전환 식물체가 개발되고 있으나 유전자 도입 식물체의 재분화체계가 확립되어 있지 않은 식물에서는 형질전환 식물체의 개발이 이루어지고 있지 않은 상태이다 (Russell et al. 1992). 지금까지 외래 유전자를 식물에 도입하는 방법으로는 전기충격에 의한 원형질 도입법 (Brewer et al.

1999; Dhir et al. 1998), *Agrobacterium* 감염법 (Lee et al. 1998; Rashid et al. 1996; Seo et al. 2002), particle bombardment 를 이용한 방법 (Kexuan et al. 1999; Snyder et al. 1999) 등이 알려져 있다. 이러한 방법 중에서 원형질 도입법은 particle bombardment가 개발되기 전에 세포내에 유전자를 직접 도입하는 기술로서 대량의 세포에 유전자를 도입할 수 있는 장점은 있으나 원형질체 분리나 배양의 어려움 때문에 그 활용이 크게 제한받고 있다. 또한 쌍자엽 및 일부 단자엽 식물의 형질전환에 많이 사용되고 있는 *Agrobacterium*법은 비교적 재현성이 높고 도입된 유전자의 유전형질이 안정적으로 다음세대에 전달되는 장점을 갖고 있지만 재분화계가 확립되어 있지 않은 식물에서는 이용하기 어려운 특징이 있다. Particle bombardment는 헬륨가스 등의 압력을 이용하여 DNA를 식물세포에 직접 쏘아 넣는 방법으로서 세포분열이 왕성한 세

*Corresponding author Tel 061-750-3890 Fax 061-750-3208
E-mail hyoyeon@suncheon.ac.kr

포조직에 의해 유전자를 직접 전이시킬 수 있는 특징을 가지고 있다. 이 방법은 최근 조직배양계가 없는 식물에 많이 적용되고 있으며, 특히 유전자의 일시적 발현을 단기간 내에 간단하게 조사할 수 있다 (Sanford 1990). 또한 기존의 유전자 도입방법으로 유전자 도입이 힘들었던 미토콘드리아나 엽록체 등의 세포 내 기관에도 유전자 도입이 가능하게 되었다 (Vera and Ulrich 1998). 그러나 유전자 도입 장비가 대단히 고가이고, 여러 단계의 조작과정이 필요하며, 장비 사용시 들어가는 재료비도 비싸기 때문에 국내의 경우 일부 연구 기관을 제외하고는 활성화되어 있지 않다. 따라서 위에서 언급한 particle bombardment의 일부 문제점을 개선하기 위해서 DNA가 코팅된 gold particle을 감압된 통로를 통하여 헬륨 가스압으로 밀어내도록 고안된 particle inflow gun (PIG)을 제작하였고 (Figure 1), 이 PIG 장비에 적합한 벼 캘러스 내 효율적 유전자 도입의 조건을 확립하는데 연구의 목적이 있다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서 사용된 벼 (*Oryza sativa* L.)는 우리나라 남부 지방에서 많이 재배되고 있는 동진 품종으로 완숙 종자를 사용하였다.

벼의 캘러스 유도 및 세포의 삼투압 조절

벼의 종피를 제거하고 70% 에탄올에서 1분간 교반한 후 4% sodium hypochloride 용액 (200 µL의 Tween 20 첨가)에 15분간 교반하면서 표면 살균하였다. 살균된 종자를 멸균수로 3회 이상 세척하고 2,4-D 2 mg/L가 포함된 캘러스 유도배지에 [N6 salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 3 g/L gelrite, pH 5.8 (Chu et al. 1975)] 종자를 치상하였다. 치상체를 25°C, 3000 lux의 연속광 조건에서 20일간 배양하여 캘러스를

유도하였다. 완숙종자의 배유와 자엽부분을 제거하고 캘러스 부분만을 채취하여 상기와 동일한 조성의 캘러스 유도 배지에 2주간 계대배양한 후 증식된 캘러스를 실험재료로 이용하였다. 유전자 도입시 사용되는 캘러스의 물리적 요인에 따른 원형질 용출의 가능성을 줄이기 위하여 0.2 M sorbitol과 0.2 M mannitol이 첨가된 N6 삼투조절배지에 캘러스를 4시간 전 배양하였고, 유전자 도입이 종료된 후 동일한 삼투조절배지에서 캘러스를 24시간 방치하였다. 그 후 유전자 도입된 배양세포는 캘러스 유도배지에 이식하였다. 본 실험의 모든 과정에서 1회 유전자 도입에 사용되는 캘러스의 양은 삼투조절처리가 끝난 벼의 캘러스 700 mg (생중량)을 이용하였다.

Plasmid DNA 추출

유전자 도입에 사용된 plasmid는 pIG121Hm (Hiei et al. 1994)으로서 T-DNA 내부에 intron GUS (β -glucuronidase)와 hygromycin phosphotransferase 및 kanamycin 저항성 유전자를 포함하고 있다 (Figure 2). pIG121Hm을 포함하는 E. coli는 hygromycin 50 mg/L, kanamycin 100 mg/L가 첨가된 YEP 액체배지에서 37°C, 6~12시간 배양하였고 plasmid DNA의 추출은 cesium chloride 밀도구배에 따른 초원심분리법에 의해 추출 정제되었다 (Radloff et al. 1967). 추출된 DNA는 1 µg/µL의 농도로 TE buffer에 희석하여 사용하였다.

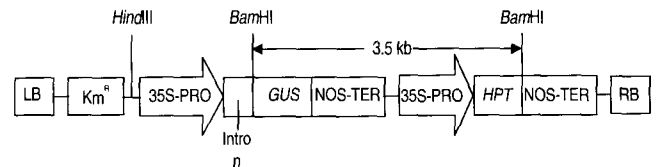


Figure 2. Schematic diagram of a part of the T-DNA region of transformation vector pIG121Hm. KmR gene for kanamycin resistance; 35S-PRO, CaMV35S promoter; Intron the first intron of the castor bean catalase gene; GUS, -glucuronidase gene; NOS-TER, 3 signal of nopaline synthase; HPT gene for hygromycin phosphotransferase.

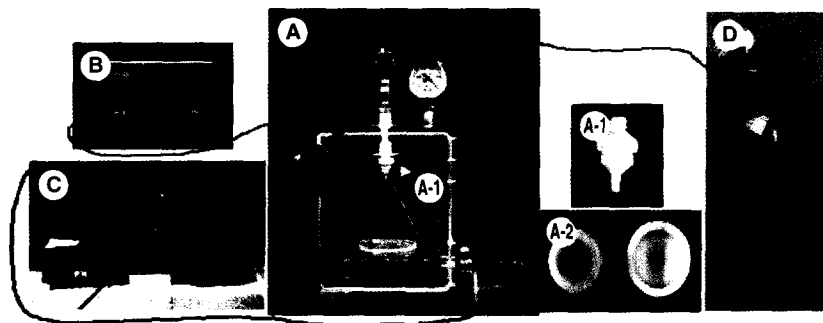


Figure 1. A homemade Particle Inflow Gun system. A: The external appearances of Particle Inflow Gun, A-1: External appearances of holder. A-2: Cross-section of holder, B: Control box, C: Vacuum pump, D: Helium gas.

Plasmid DNA의 금입자 코팅 및 PIG 사용조건

Plasmid DNA의 금입자 코팅은 Finer 등 (1992)의 방법을 기준으로 일부를 수정하여 사용하였다. 본 실험에서 사용된 기본적인 금입자 코팅 방법은 다음과 같다. 2 mg의 금입자 (1 회: 0.2 mg, 10회분)를 effendorf tube에 취한 후 70% 에탄올 300 μ L를 첨가하여 초음파 처리에 의해 금입자를 세정하였다. 원심분리에 의해 상층액을 제거한 후 plasmid DNA 8 μ L (1 μ g/ μ L, 1 회: 0.8 μ g, 10회분), 멸균수 142 μ L, DNA 용액의 1/10양의 3 M sodium acetate, DNA 용액의 2.5배양의 에탄올을 차례로 넣어 plasmid DNA를 금입자에 코팅하였다. 상기의 금입자 현탁물을 -20°C에서 15분간 방치하고 원심분리에 의해 상층액을 제거한 다음 70% 에탄올을 첨가하여 금입자를 세정하였다. 금입자 세정 후 100% 에탄올 200 μ L를 첨가하여 초음파 처리에 의해 금입자 덩어리를 풀어준 다음 PIG 장비 내의 holder에 1회에 20 μ L (0.01 mg/ μ L)씩 도말하여 사용하였다. 벼 세포의 유전자 도입시 PIG 장비의 사용조건은 12 cm의 분사거리에서 760 mmHg의 chamber 내의 진공압과 3.5 bar의 헬륨 가스압으로 조절된 후 코팅된 DNA 금입자를 분사하였다.

코팅된 DNA 금입자 양에 따른 유전자 도입 효율

코팅된 DNA 금입자 양에 따른 벼 세포내의 유전자 도입 효율을 조사하기 위해 1회 분사되는 금입자 양을 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg으로 각각 조절하였다. 본 실험에서 각 처리구 별로 DNA 금입자 양을 조절된 것 이외의 모든 과정은 상기의 DNA 금입자 코팅과정과 동일하다.

Spermidine과 calcium chloride 처리 농도에 따른 유전자 도입 효율

DNA를 금입자에 코팅하는 과정에서 금입자와 DNA의 부착력에 영향을 줄 수 있는 spermidine과 calcium chloride의 최종 농도를 다음과 같이 조사하였다. 먼저 spermidine의 경우 상기의 DNA 금입자 코팅과정에서 3 M sodium acetate를 첨가한 후 spermidine을 0, 8, 16, 32, 80 mM의 농도로 각각 조절된 용액을 첨가하였다. Calcium chloride의 경우도 3 M sodium acetate를 첨가한 후에 0, 0.2, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0 M의 농도로 조절된 calcium chloride 용액을 각각 첨가하였다. 위의 spermidine과 calcium chloride 첨가를 제외한 모든 과정은 상기의 DNA 금입자 코팅과 동일하게 진행되었으며 각 처리구에 대해 3반복 하였다.

PIG 장비의 분사거리 및 분사압력의 조절

PIG 장비를 이용하여 세포내에 물리적으로 유전자를 도입

하는 과정에서 최소한의 손상을 주면서 효율적으로 유전자가 도입될 수 있는 기기적 조건을 규명하기 위해 실시하였다. 우선 코팅된 DNA가 들어 있는 분사 holder로부터 피사체인 캘러스가 놓여 있는 샤페까지의 분사거리를 9 cm와 12 cm로 조절하였고, 또한 분사시 사용되는 헬륨 가스압력을 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 bar로 각각 조절한 후 DNA 코팅된 금입자를 분사하였다.

GUS 활성의 조직화학적 분석

유전자 도입이 완료된 벼 캘러스를 삼투 조절배지에서 24 시간 방치한 후 캘러스 유도배지에 이식하였다. 그 후 7일간 캘러스 유도배지와 동일한 조건에서 배양한 후, Jefferson 등 (1987)의 방법에 따라 GUS 활성을 조사하였다. 벼 캘러스 조직을 튜브에 넣고 5-bromo-4-chloro-3-indoleglucuronide (X-Gluc)가 포함된 1 mL의 GUS 염색액을 첨가한 후 37°C에서 48시간 처리하였다. 그 후 70% 에탄올로 세척하여 생중량 1000 mg 당 blue spot을 띤 캘러스 수를 기준으로 하여 GUS 발현율을 조사하였다

결과 및 고찰

코팅된 DNA 금입자 양에 따른 유전자 도입 효율

유전자 도입 효율은 DNA로 코팅된 금입자의 양에 따라서 많은 차이를 보여주었다. 1회 분사되는 금입자의 양이 많아질수록 GUS 발현율은 점차 증가하기 시작하여 2 mg의 처리구에서 가장 많은 174.4개의 blue spot이 관찰되었다 (Figure 3A, 4A). 이것은 0.2 mg 처리구에 비해 약 6배의 증가를 보여준 것이다. 그러나 4 mg의 처리구에서는 오히려 GUS 발현을 감소시켰다. 이러한 결과는 일정량 범위 내에서는 금입자 양이 증가할수록 금입자에 부착되는 DNA 양이 증가되지만 금입자에 부착될 수 있는 DNA 양은 한계가 있기 때문에 이러한 DNA 양을 고려하지 않고 금입자 양만을 높이는 것은 유전자 도입에 비효율적이라는 것을 말해준다. 또한 일정한 세포수에 많은 양의 금입자 분사는 세포에 물리적 손상을 상대적으로 많이 주어 유전자 도입 후 세포의 회복에 많은 지장을 주기 때문에 바람직하지 않는 것으로 생각한다. 본 연구 결과와 유사한 연구가 밑에서도 보고되었다 (Rasco et al. 1999). 이들의 연구에서도 15 μ g의 적은 양의 금입자는 GUS 발현율을 감소시킨 반면 일정한 양 이상의 처리 구에서는 GUS 발현이 더 이상 증가하지 않는다고 보고하였고, 또한 세포조직이 받는 손상을 줄이기 위해서도 1회 분사시 사용되는 금입자의 양을 최소화하는 것이 중요하다고 보고하였다.

Spermidine과 calcium chloride 처리 농도에 따른 유전자 도

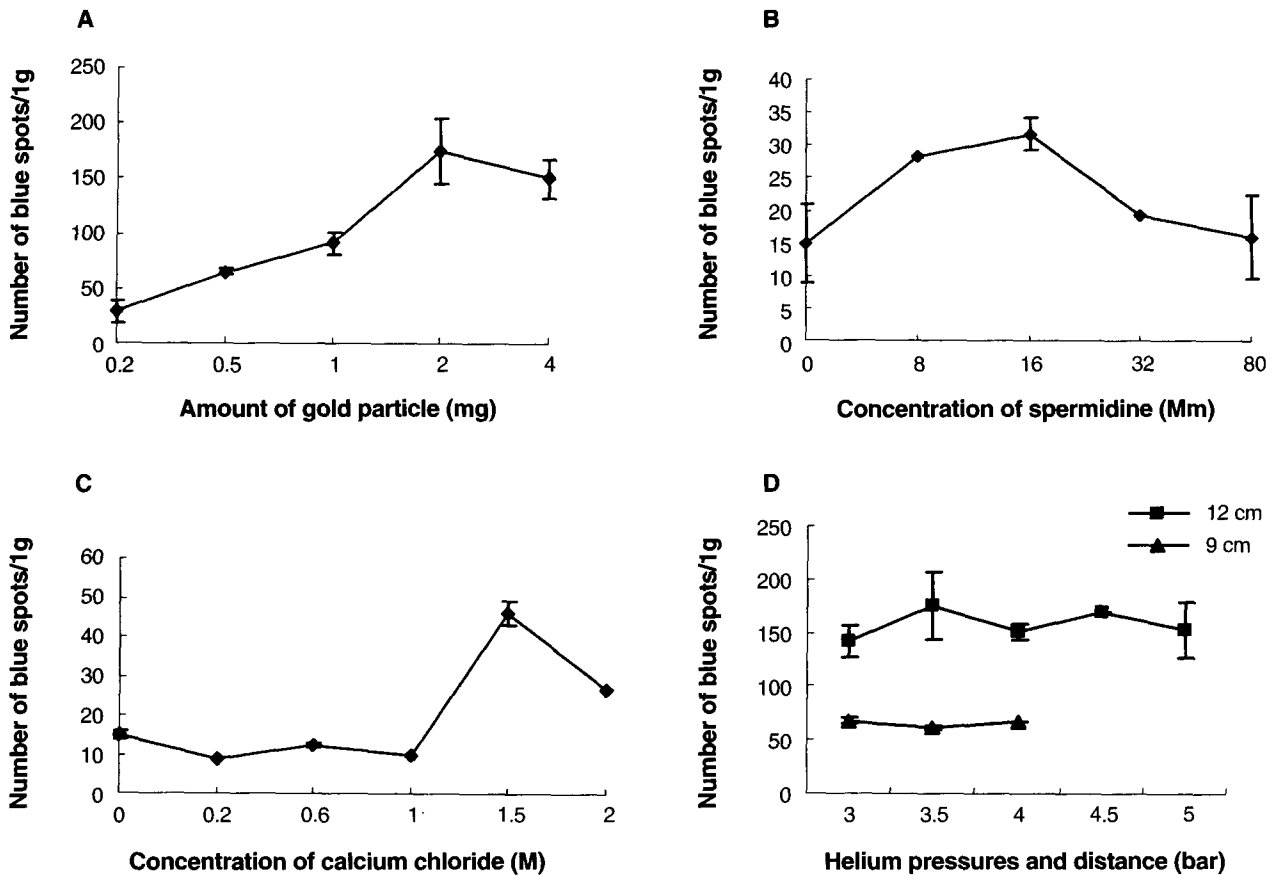


Figure 3. Effect of different DNA delivery parameters on transient GUS expression. A: Amount of gold particles, B: Spermidine concentration, C: Calcium chloride concentration, D: Helium pressures and shooting distance. Bars indicate the standard error.

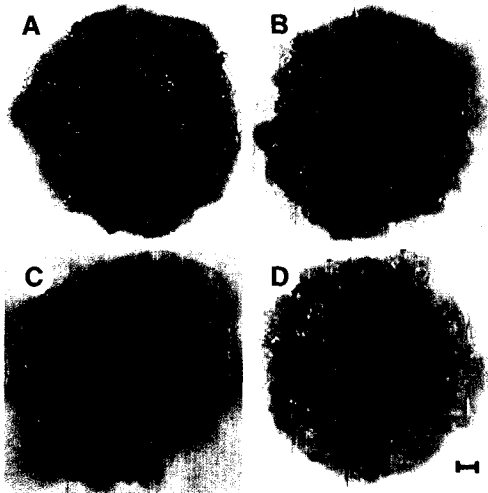


Figure 4. Optimal transient GUS expression in rice callus bombarded under different DNA delivery conditions. A: Amount of gold particle (2 mg), B: Spermidine concentration (16 mM), C: Calcium chloride concentration (1.5 M), D: Helium pressure (3.5 bar) and shooting distance (12 cm). Scale bars represent 1mm.

입 효율

DNA를 금입자에 코팅하는 과정에서 spermidine과 calcium

chloride의 첨가는 GUS 유전자 도입효율에 많은 차이를 보여 주었다. 먼저 spermidine농도에 따른 GUS 발현은 Figure 3B에서 보여주는 것과 같이 spermidine 농도가 증가할수록 GUS 발현이 증가하여 16 mM 농도에서 31.74개로 가장 높았고 그보다 높은 농도에서는 발현이 낮았다. 이것은 spermidine 무첨가구에 비해 약 2배의 증가를 보여준 것이다. 이러한 결과는 적정농도의 spermidine이 DNA 부착력을 강화시켜 금입자 세정과정 중 부착된 DNA의 손실을 최소화시켜 주었기 때문이며 고농도의 spermidine은 오히려 DNA 부착력을 저하시키기 때문이라고 생각한다. 본 연구 결과와 유사한 연구가 밑에서도 진행되었는데 이들의 연구에서도 8~16 mM 사이의 spermidine이 GUS 발현에 효과적이었다고 보고하였다 (Rasco et al. 1999). 그러나 Taylor과 Vasil (1991)은 고농도 (100~500 mM)의 spermidine이 유전자 도입에 효과적이었다고 보고하고 있다. 이러한 연구결과를 살펴보면 spermidine의 첨가량은 식물종과 세포 조직에 따라서 차이가 있는 것으로 생각된다.

Calcium chloride 농도에 따른 GUS 유전자 도입효율의 경우 1 M 농도까지는 각 처리구별로 큰 차이를 보이지 않았으나, 1.5 M의 농도에서는 약 46.03개로 가장 많은 GUS발현이 관찰되었다. 이것은 무첨가구에 비해 약 3배의 증가를 보여준 것이다 (Figure 3C, 4C). 그러나 2 M의 고염 농도는 오히려

GUS 발현을 감소시켰다. 이와 같은 결과는 적정농도의 calcium chloride가 gold particle과 DNA 부착 과정 중 DNA 부착력을 강화시키기 때문이며 이와 유사한 연구결과가 밀 (Rasco et al. 1999)과 옥수수 (Klein et al. 1988)에서도 보고되었다. 그러므로 금입자 세정과정 중 DNA 손실의 최소화를 위해서는 적정 농도의 calcium chloride를 첨가하는 것이 중요하다고 생각된다.

PIG 장비의 분사거리 및 분사압력에 따른 유전자 도입효율

GUS 유전자 도입효율은 분사시 사용되는 헬륨 가스압력과 분사 거리에 따라 많은 차이를 보여주었다. 먼저 분사 거리에 따른 GUS 유전자 도입효율을 조사한 결과 9 cm의 단거리에서 보다 12 cm의 장거리에서 더 효과적이었다 (Figure 3D, 4D). 그 이유는 금입자가 피사체인 캘러스에 골고루 퍼지면서 캘러스가 튀지 않을 정도로 충분한 거리를 비스듬히 가속되어야 캘러스 조직이 받는 손상이 적으면서 세포에 효율적으로 도입되기 때문이라고 생각된다. 본 논문에서는 6 cm 분사 거리의 결과를 제시하지 않았지만 이러한 조건에서 분사된 금입자는 캘러스가 모두 튀어 버리는 결과를 초래하였으며 캘러스 조직에 강한 손상을 주어서 결과적으로 세포를 피사시키는 경우가 많았다. 따라서 피사체가 튀지 않는 정도의 거리 범위 내에서 금입자가 가장 널리 분사될 수 있는 분사 거리를 조사하는 것이 중요한 요인이라 생각된다. 분사시 사용되는 헬륨 가스압력의 경우 9 cm의 분사 거리에서는 GUS 발현에 헬륨 가스압력의 영향을 거의 받지 않았다. 그 이유는 단거리에서 금입자가 분사될 경우 과중한 분사압력으로 인하여 금입자가 분사되는 범위에 제약을 미치지 때문이라고 생각된다. 또한 4 bar 이상의 분사 압력에서는 캘러스와 배지 모두 튀어버리는 현상을 초래하였다. 그러나 12 cm의 분사 거리에서는 가스 압력에 따라 GUS 발현에 약간의 차이를 보이고 있고, 특히 50 psi (3.5 bar)에서 가장 많은 GUS 발현이 관찰되었다. 그러한 이유는 낮은 가스압력일수록 금입자를 널리 분사시킬 수 있기 때문이라고 생각된다. 본 연구에서 사용된 장비는 가스압력이 50 psi 정도이면 충분하지만 기존에 많이 사용되고 있는 bombardment는 약 1100 psi 정도의 높은 헬륨 가스압력을 요구하고 있다. 따라서 본 연구에 사용된 PIG는 기존의 장비와 비교해서 약 20배의 낮은 헬륨 가스압력으로 세포내에 유전자를 도입할 수 있는 특징을 갖고 있다. 물론 가스압의 결정은 발사구로부터 피사체가 놓여 있는 분사 거리에 따라서 가스압력을 조절할 필요가 있으나, 그 보다 더욱 중요한 요인은 하나의 가스압 조건을 설정해서 계속 사용하지 말고 식물 세포의 생리·물리적 특성을 파악해서 세포에 손상을 최소한으로 줄이는 조건을 이용하는 것이 최선의 유전자 도입조건이라 생각된다.

이상의 연구를 종합해 보면 본 연구에서 확립한 여러 조건은 벼를 포함한 단자엽 식물의 배양세포에 매우 효율적인 유

전자 도입법으로 생각되며, 동시에 분사에 사용되는 일회용 부품들이 필요하지 않으므로 매우 저렴한 비용으로 유전자 도입이 가능하기 때문에 앞으로 식물의 기능 유전자 발현을 연구하는데 많이 이용되리라 생각된다. 그러나 본 장비는 배양세포를 중심으로 유전자 도입 효율 조건을 검토하였기 때문에 향후 식물의 생장점, 잎 등의 기타 조직을 이용한 유전자 도입 실험을 진행할 경우 본 실험 조건을 참고하여 일부 조건을 재조정할 필요가 있다고 생각한다.

사사 - 본 논문은 한국과학기술재단 (KOSEF)에서 지원하는 전남대 농업식물 스트레스 연구센터 (APSRC) 및 바이오그린21(2002년)사업 연구지 비원에 의해 일부 수행된 것임.

적 요

본 연구실에서 개발된 particle inflow gun (PIG)은 조작이 간편하고, 사용비용도 저렴하며, 식물 세포 내의 유전자 도입 효율이 높은 특징을 갖고 있다. PIG 장비를 이용하여 벼 캘러스 내로의 유전자 도입 조건을 검토하기 위해서 사용된 vector는 pIG121Hm으로서 T-DNA 내부에 intron GUS (β -glucuronidase)와 hygromycin 및 kanamycin 저항성 유전자를 포함하고 있다. 또한 벼 캘러스 내에 물리적으로 DNA를 도입할 때에 DNA 도입 효율과 관계가 높은 요인들을 GUS의 발현빈도를 통하여 조사하였다. 그 결과 gold particle에 DNA를 부착하는 과정에 사용되는 spermidine과 calcium chloride의 경우 무첨가구에 비해 16 mM의 spermidine과 1.5 M의 calcium chloride 첨가구에서 GUS 발현율이 각각 2배, 3배 증가하였다. 그리고 1회 분사되는 gold particles 양이 2 mg의 경우 가장 높은 GUS 발현율을 보여주었으며, 또한 PIG 장비의 분사거리와 헬륨의 압력은 벼의 배양세포의 경우 12 cm의 분사거리에서 3.5 bar (50 psi)의 헬륨압력으로 분사하였을 때 GUS 발현율이 가장 높았다. 이상의 결과에서 PIG 장비를 이용한 유전자 도입은 본 연구에서 검토한 최적의 조건을 이용하였을 경우 기존에 많이 사용되고 있는 Biolistic Gun (Bio-Rad 사)과 거의 비슷한 유전자 도입효율을 보여 주었다. 특히 PIG 장비의 경우 조작이 매우 간편하고, 분사에 사용되는 일회용 부품이 필요하지 않기 때문에 대량의 반복실험을 필요로 하는 연구에서 손쉽게 사용되리라 기대된다.

인용문헌

Brewer EP, Saunders JA, Angle JS, Chaney RL, McIntosh MS (1999) Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. Theor Appl Genet

- 99:761-771
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY** (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* **18**:659-668
- Dhir SK, Oglesby J, Bhagsari AS** (1998) Plant regeneration via somatic embryogenesis, and transient gene expression in sweet potato protoplasts. *Plant Cell Rep* **17**:665-669
- Finer JJ, Vain P, Jones MW, McMullen MD** (1992) Development of particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep* **11**:323-328
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T** (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* **6**:271-282
- Jefferson RA** (1987) Assaying chimeric genes in plant :the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* **5**:397-405
- Kexuan T, Pomtip T, Yanan X, Xiaofen S, John AG, Pamela CR, Huaxiong Q, Xingguo L, Paul C, Ajay K** (1999) Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. *Planta* **208**:552-563
- Klein TM, Gradziel T, Fromm ME, Sanford JC** (1988) Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Technol* **6**:559-563
- Lee HY, Lee CH, Kim HI, Han WD, Choi JE, Kim JH, Lim YP** (1998) Development of bialaphos-resistant transgenic rice using *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J Plant Tiss Cult* **25**:283-288
- Radloff R, Bauer W, Vinograd J** (1967) A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA-the original description of ethidium bromide density gradient centrifugation. *Proc Natl Acad Sci USA* **57**:1514-1521
- Rasco Gaunt S, Riley A, Barcelo P, Lazzeri PA** (1999) Analysis of particle bombardment parameters to optimize DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Rep* **19**:118-127
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K** (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in Indica rice. *Plant Cell Rep* **15**:727-730
- Russell JA, Roy MK, Sanford JC** (1992) Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol* **98**:1050-1056
- Sanford JC** (1990) Biolistic plant transformation. *Physologia Plantarum* **79**:206-209
- Seo MS, Bae CH, Choi DO, Rhim SL, Seo SC, Song PS, Lee HY** (2002) Investigation of transformation efficiency of rice using *Agrobacterium tumefaciens* and high transformation of GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) gene relative to chilling tolerance. *Korean J Plant Tiss Cult* **29**:85-92
- Snyder GW, Ingersoll JC, Smigocki AC, Owens LD** (1999) Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment. *Plant Cell Rep* **18**:829-834
- Taylor MG, Vasil IK** (1991) Histology of and physical factors affecting transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) embryos following microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep* **10**:120-125
- Vera H, Ulrich K** (1998) Splicing of the mitochondrial group-II intron rII: conserved intron-exon interactions diminish splicing efficiency. *Curr Genet* **33**:117-123

(접수일자 2002년 9월 4일)