

Marker Gene의 직접삽입에 의한 Transgenic Plant의 제조 및 전기융합*

유장걸**, 소인섭***, 홍경애****

Electrofusion and Preparation of Transgenic Plant by Direct Insert of Marker Genes*

Zang-Kual U. **, In-Sup So***, Kyung-Ae Hong****

Summary

The conditions required for plant transformation through the *Agrobacterium tumefaciens* system and the electroporation method were investigated for *Raphanus sativus* L. and *Brassica rapa* L.

1. The highest viability of protoplasts was obtained when 7 days and 10 day-old seedlings were used.
2. The optimum conditions for electroporation was 1.77 kV/cm for 40 μ sec under which 70% of the protoplasts were viable and 58% of the viable protoplasts were stained with methylene blue.
3. The pBin19 plasmid used as a carrier vector was isolated from *E. coli* DH5 α , purified and identified on the electrophoresis agarose gel.
4. The triparental mating was performed for pBin19/DH5 α (kana+), pRK2013/HB101(kana+), and LBA4404(strep+) of *Agrobacterium tumefaciens*, and confirmed using the mixture medium of kanamycin and streptomycin. The band of pBin19 isolated from the transconjugated *Agrobacterium tumefaciens* was also observed on the agarose gel electrophoresis.
5. Cell differentiation was observed from the leaf disks infected with the transconjugated *Agrobacterium tumefaciens* after 15 days cocultivation on the medium containing cefotaxime 200ppm and kanamycin 100ppm.

* 본 논문은 1991년도 교육부 학술연구 조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

** 농과대학 농화학과(Dept. of Agricultural Chemistry, Cheju Univ., Che-do, 690-756, Korea)

*** 농과대학 원예학과

**** 대학원 농화학과(박사과정)

서 론

식물의 형질 전환을 목적으로 하는 생물공학의 기법중에서 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법중의 하나는 토양세균인 *Agrobacterium*이 갖고 있는 Ti-plasmid나 Ri-plasmid를 이용하는 것으로 이는 쌍자엽 식물의 유전자를 도입하는데 효과적인 것으로 알려져 있다(Bang *et al.* 1990; James *et al.* 1989; Manners 1987; Park *et al.* 1991; Srivastava *et al.* 1988). 그러나 DNA를 직접 원형질체에 넣은 뒤에 배양함으로써 형질 전환 식물체를 얻는 방법도 많이 시도되고 있다(Suh *et al.* 1990; Wolf *et al.* 1989; Zhang *et al.* 1988). 즉 외래 유전자를 원형질체내에 집어 넣고 삽입된 reporter 유전자를 확인함으로써 유용 유전자를 지닌 형질 전환체를 얻는 것으로서 이것은 protoplast를 재생시킬 수 있는 식물의 경우에만 가능하다는 제한 조건을 갖고 있다.

따라서 본 실험은 marker gene인 외래 유전자를 갖고 있는 대장균을 배양하여 유전자를 증폭시킨 뒤 plasmid DNA를 순수분리하고 이를 전기 충격법(electroporation)으로 protoplast에 직접 전이(Michael *et al.* 1988) 시켜서 marker gene을 포함하는 cell line을 확보하여 subculture 시킨 뒤 그 callus를 이용하여 원형질체를 분리하고 이를 전기용합시켜 선별배지에서 융합체만을 선별 배양하여 hybrida를 창출하는 기법을 확립하고자 시도했으며 한편, 원형질체로부터의 재생이 잘 되지 않은 식물의 경우에 이용할 수 있는 *Agrobacterium tumefaciens* system에 의한 gene transfer 기법에 관하여도 함께 검토하였다.

재료 및 방법

실험 I. 전기충격법(electroporation)에 의한 원형질체로의 유전자 삽입을 위한 조건 검토

1. 공시 식물

무우(청수궁중무우)와 배추(서울엇갈이 배추) 종자를 2% NaOCl과 0.05% Tween-20 혼합용액에 20

분 동안 침적 살균한 후 멸균수로 잘 세척하여 0.7% agar를 포함하는 MS 배지에 파종하고 1500lux, 25±2°C에서 7~15일 생육시킨 뒤 사용하였다.

2. Protoplast 분리

무균적으로 생육된 배추와 무우의 엽육조직을 5×5mm의 크기로 잘라 4% Cellulase R-10, 0.3% Hemicellulase, 10mM CaCl₂, 10mM MES, 0.6M sorbitol(pH 5.8) 용액에 넣어 25±2°C에서 5~6시간 동안 암배양한 뒤에 88µm sieve로 거른 후 100xg에서 원심분리하여 pellet을 얻은 다음 0.6M sorbitol+CPW(Table 1) 용액에 넣어 100xg에서 원심분리하여 상정액을 제거하였다.

Table 1. Composition of the cell and protoplast washing solution(CPW) for protoplasts isolation from mesophyll cell of radish and cabbage

| Salts used | Concentration (mM) |
|--|--------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 200 |
| KNO ₃ | 1000 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 11000 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1000 |
| KI | 1 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.2 |
| MES | 10 |
| 0.6M sorbitol CPW : 0.6M sorbitol+CPW solution | |
| 0.6M sucrose CPW : 0.6M sucrose+CPW solution | |

순수한 protoplast를 획득하기 위하여 0.6M sucrose+CPW 용액과 0.6M sorbitol 용액으로 밀도차를 준 다음 다시 100xg에서 원심분리하여 하층의 sucrose 용액과 상층의 sorbitol 용액사이에 존재하는 protoplast를 채취하였다.

3. Plasmid DNA 분리 및 확인

1) 사용된 *E. coli* 균주 및 배양

Kanamycin 유전자를 함유한 *E. coli* (pBin19/DH5α)를 이용했는데 pBin19는 *Eco*RI, Hind III 등이 작용할 수 있는 multiple cloning site를 갖고 Tn 5에서 온 aminoglycoside phosphotransferase II gene, 그리고 식물에서 transcription 되기 위해 필

요한 nos gene을 갖고 있으므로 이것이 식물체에 삽입되었을 때 그 식물세포는 kanamycin 저항성을 갖게 된다.

단일의 colony를 백금이로 취하여 액체배양시킨 뒤 소량(0.5ml)씩 -20°C에 저장하여 놓고 필요할 때마다 100µl를 취하여 50ml의 2×LB(+kana 50µg/ml)에 넣고 37°C의 진탕 배양기에 하룻밤 배양시켰다.

2) Alkali법에 의한 plasmid 분리 정제

위에서 배양된 *E. coli* 배양액을 1.5ml씩 microfuge tube에 취하여 4°C, 8,000xg에서 3분간 원심분리하여 침전시킨 다음 최종 농도가 2mg/ml 되도록 조절된 lysozyme (大澤과 掘田 1990; 鈴木과 山本 1990)을 포함하는 100µl의 Sol I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)) 용액을 넣어 vortex mixer로 격렬하게 혼합한 후 5분간 얼음속에 방치시켰다. 여기에 신선하게 조제된 200µl의 Sol II (0.2N-NaOH, 1% SDS)를 가하여 빠르게 4~5회 정도 혼합한 후 5분간 얼음속에 방치시켰다.

이 용액에 150µl Sol III (5M potassium acetate, glacial acetic acid, H₂O)를 넣어 가볍게 흔들면서 섞이도록 한 다음 얼음물 중에 5분간 방치하고 4°C, 8,000xg에서 5분간 원심분리하였다. 상정액을 새로운 tube에 옮긴 후 동량의 phenol : chloroform (1 : 1)을 가해 vortex mixer로 격렬히 교반한 다음 4°C, 8,000xg에서 3분간 원심분리하여 상정액을 새로운 tube에 옮겼다. DNA를 침전시키기 위하여 상정액의 2배에 해당하는 ethanol을 가하여 잘 혼합한 후 2분간 상온에 방치한 다음 4°C, 8,000xg에서 5분간 원심분리하였다. DNA침전이 빠져 나가지 않도록 조심스럽게 상정액을 버리고 70% ethanol 1ml를 가하고 4°C, 8,000xg에서 2분간 원심분리하여 상정액을 제거하고 진공 건조기에서 건조시켜 정제 분리된 plasmid DNA를 얻었다.

3) 전기영동에 의한 plasmid DNA 확인

건조된 DNA 침전을 RNase (20µg/ml)를 포함하는 TE (10mM Tris-Cl, 5mM EDTA, pH 8.0) buffer 20µl에 용해시키고 전기 영동하였다.

4. Electroporation

배추와 무우에서 분리된 protoplast pellet에 HBM

[1 mM HEPES (pH 7.0), 10% Mannitol] buffer 2ml를 넣어 2회 세척한 후 원형질체의 밀도가 1×10⁶/ml가 되도록 HBM buffer용액으로 희석시켰다.

먼저 electroporation 조건을 검토하기 위하여 DNA대신에 methylene blue 염색용액 10µl (0.5mM)와 1ml의 protoplast 현탁액을 혼합시킨 뒤 0.5ml씩을 electroporation chamber에 넣어 전압을 달리하면서 원형질체의 viability, 원형질체의 파괴 여부, 염색액의 침투 정도 등을 조사하였다.

Electroporator는 Electro Cell Manipulator 401A (BTX Inc. San Diego, California, USA) (Zimmerman and Scheurich, 1981)를 사용하였다.

실험 II. *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 gene transfer

1. 공시식물

공시식물은 실험 1)에서 배양한 배추를 사용했으며 사용 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404와 vector로서 pBin19/DH5α 및 helper로서 pRK2013/HB101 *E. coli*이었다.

2. 공시 균주의 배양 및 triparental mating

1) 배양

*E. coli*의 두 균주는 모두 kanamycin 저항성 유전자를 갖고 있기 때문에 50µg/ml 농도의 kanamycin이 들어 있는 LB-Broth 배지에서 37°C를 유지하며 하룻밤 진탕 배양했다.

한편, *Agrobacterium tumefaciens*는 streptomycin 저항

Table 2. Composition of M9 salts medium

| Constituent | Concentration |
|----------------------------------|------------------------|
| M9 salts (10X) | |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.5M |
| KH ₂ PO ₄ | 0.17M |
| NaCl | 0.125M |
| NH ₄ Cl | 0.1M |
| MgSO ₄ | 1M |
| CaCl ₂ | 0.1M |
| Sucrose | 20% (for <i>Agro</i>) |
| Glucose | 20% (<i>E. coli</i>) |

성 유전자를 갖고 있기 때문에 streptomycin (100 μ g/ml)이 첨가된 M9 배지 (Table 2)에 단일의 colony를 백금으로 취하여 접종하고 30°C에서 격렬하게 진탕하면서 2일간 배양하였다 (하얀 현탁액으로 됨).

2) 교배 (mating)

이상에서 각각 따로 배양된 *E. coli*와 *Agrobacterium tumefaciens*를 각각 100 μ l씩 취하여 M9 배지로 3회 세척 후 혼합하여 LB-agar 고체배지에 100 μ l를 plating하고 30°C에서 2일간 배양하여 triparental mating을 시켰다.

형성된 colony의 일부를 백금으로 취하여 kanamycin (50 μ g/ml)과 streptomycin (100 μ g/ml)이 첨가된 M9배지에서 2일간 30°C로 격렬하게 진탕배양하여 triparental mating이 잘 이루어진 *Agrobacterium tumefaciens*만을 얻었다.

3. Triparental mating 시킨 *Agrobacterium tumefaciens*의 접종 처리 및 엽조직배양

무균적으로 배양된 배추의 엽육조직을 10×10mm의 크기로 절단한 다음 엽육조직 절편을 triparental mating된 *Agrobacterium tumefaciens* 군주에 침적시켰다.

군주 접종이 끝난 엽육조직 절편을 48시간 cocultivation한 후 멸균증류수로 3회 세척하고 남아 있는 물기를 멸균된 filter paper로 제거한 후 NAA 3ppm과 BA 0.5ppm, kanamycin 100ppm 그리고 군주의 제거를 위하여 cefotaxime 200ppm을 처리하여 조직배양실에서 배양하였다.

4. 전기영동법에 의한 triparental mating 확인

plasmid DNA (helper 및 pBin19 vector)를 *E. coli*로부터 분리하고 또 *Agrobacterium tumefaciens*는 교배시키기 전과 시킨 뒤의 것을 모두 *E. coli* plasmid 분리법에 준해서 plasmid를 분리시키고 전기영동시켰다. 이때 *E. coli*에서 분리한 pBin19 plasmid, pRK2013 plasmid, mating 전의 *Agrobacterium* plasmid, mating 시킨 뒤의 *Agrobacterium* plasmid를 *Eco*RI 및 Hind III로 digestion 시켜서 λ *Eco*RI marker와 비교했다.

결과 및 고찰

실험 I. 전기 충격법에 의한 원형질체로의 유전자 삼입을 위한 조건 검토

1. 원형질체의 분리

원형질체 배양을 위하여 사용된 무우와 배추의 경우에 원형질체 배양에 적절한 시기는 무우는 과종후 7일, 배추의 경우에는 과종후 10일에서 가장 좋은 원형질체 수율과 viability를 보였고 그 이후에는 세포가 노쇠하여 원형질체 분리에 적당하지 못했다.

2. Plasmid DNA 분리 정제

alkaline법으로 *E. coli*에서 plasmid를 분리 정제하여 전기영동 시킨 결과는 Fig. 1과 같으며 marker (λ *Eco*RI)와 비교했을때 그 분자량의 크기가 10kb로서 pBin19임이 확인되었을 뿐 아니라 plasmid DNA 수율도 양호해서 electroporation에 충분히 사용할 수 있다고 사료된다.

1 2 3

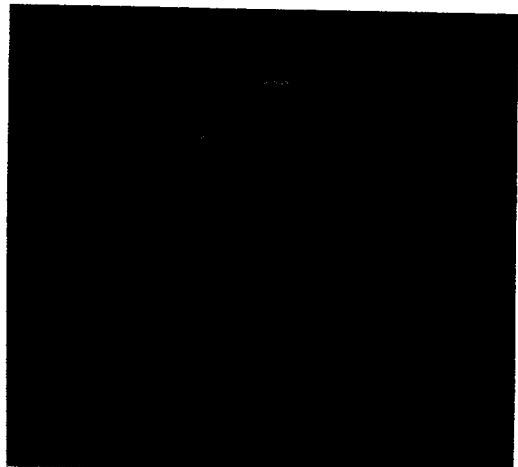


Fig. 1. Electrophoretic patterns of pBin19 plasmid vector and the molecular marker (λ *Eco*RI).
Lane 1 : pBin19
Lane 2 : pBin19/*Eco*RI
Lane 3 : Marker (λ *Eco*RI)

3. Electroporation 조건 검토

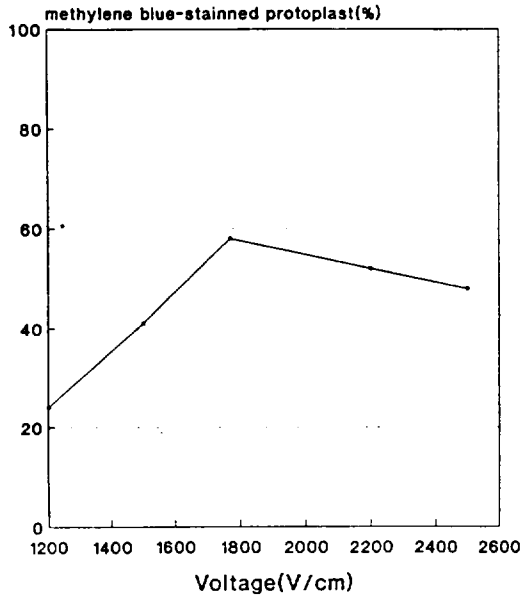


Fig. 2. Percentages of methylene blue-stained protoplasts, affected by the applied voltages of the electroporators.

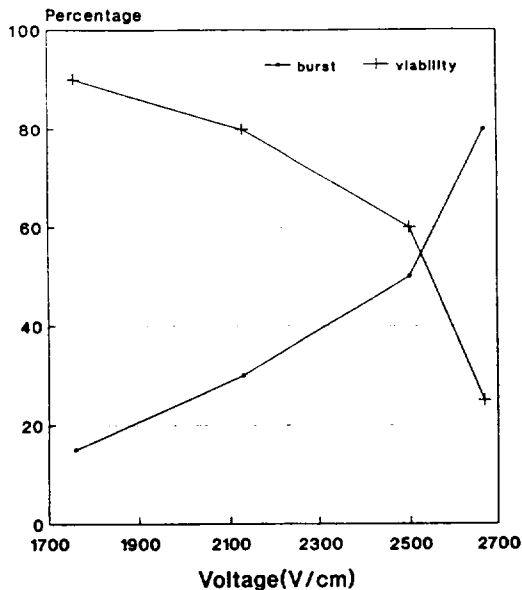


Fig. 3. Changes of protoplast burst degree and viability influenced by the applied voltages.

electroporation에 의한 고등식물체로의 외래 유전 인자의 도입은 전기적 자극하에서 식물세포가 안정적으로 생존력을 유지할 수 있는 조건에서 electroporation을 행하였을 때에만 원형질체 배양시 높은 효율을 갖는 형질전환 개체를 얻을 수 있다. 따라서 본 실험에서는 여러 조건하에서 electroporation을 행하고 FDA 처리로 원형질체의 생존율을 조사하였다.

원형질체의 생존율은 voltage가 증가할 수록 감소하였으며 burst율 또한 증가하였다(Fig. 2와 3). Hwang 등(1989)의 보고에서와 같이 이는 전기충격시 높은 열의 발생으로 원형질체의 생존율이 감소한다는 결과와 일치하였다.

electroporation을 통한 methylene blue dye 삽입은 1.77kV/cm, 40 μ sec일때 생존율 70%, dye 삽입율 58%로 가장 좋았으며(Fig. 4) voltage가 더 증가하게 되면 원형질체가 깨지므로 dye 삽입율 또한 줄어들었다.

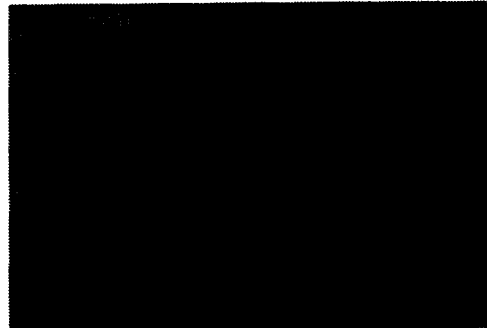


Fig. 4. Protoplasts stained with methylene blue by electroporation.

서등(1990)의 경우 벼 원형질체로부터 electroporation을 통한 형질전환 식물체 재생의 실험에서 300V, 200nF에서 적정 수준을 보였다고 하였으나 조건 표시 단위상의 차이때문에 직접 비교할 수는 없었으나 Hwang과 Hwang(1989)의 electroporation 조건 검토 결과인 750V/cm에서 생존율 60%인 결과와는 유사하였다. Nishiguchi 등(1987)의 담배 원형질체에 대한 TMV의 유도실험에서 200V(0.67kV/cm), 10msce 일때 원형질체의 80~90%가 TMV에 의해 감염되었다는 보고와는 많이 달랐으며 Planckaert와 Walbot(1989)은 maize의 형질전환에서 450V/cm에서

가장 이상적이었다고 하였는데 이는 식물재로나 세포의 연령, 크기, 조직의 구성요소 등에 따라 차이가 나는 것으로 보여진다.

그러나 본 실험에서는 무우와 배추의 엽육세포에서 분리한 protoplast의 경우 크기나 생육조건 등이 비슷하여 같은 조건에서 electroporation을 행할 수 있기 때문에 cell fusion을 수행할 때 편리할 것으로 생각된다.

실험 II. *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 gene transfer

1. *Agrobacterium tumefaciens*의 triparental mating 및 plasmid 분석

pBin19/DH5 α (kanamycin 저항성)와 helper로서 pRK2013/HB101 (kanamycin 저항성)을 *Agrobacterium tumefaciens* (streptomycin 저항성)와 triparental mating 시킨 결과 kanamycin (50 μ g/ml) 과

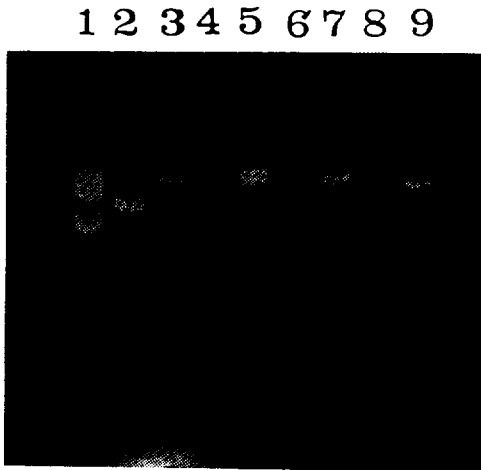


Fig. 5. Agarose gel electrophoretic patterns of plasmids (*Eco*RI digested) and the marker (λ *Eco*RI).

- Lane 1 : pBin19
- Lane 2 : pBin19/*Eco*RI
- Lane 3 : pRK2013
- Lane 4 : pRK2013/*Eco*RI
- Lane 5 : *Agrobacterium tumefaciens*
- Lane 6 : *Agrobacterium tumefaciens*/*Eco*RI
- Lane 7 : Transconjugated *A. tumefaciens*
- Lane 8 : Transconjugated *A. tumefaciens*/*Eco*RI
- Lane 9 : Marker (λ *Eco*RI)

1 2 3 4 5 6 7 8 9

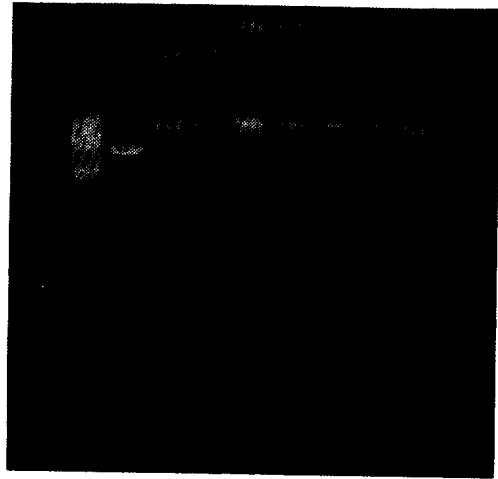


Fig. 6. Agarose gel electrophoretic patterns of plasmids (*Hind* III digested) and the marker (λ *Eco*RI).

- Lane 1 : pBin19
- Lane 2 : pBin19/*Hind* III
- Lane 3 : pRK2013
- Lane 4 : pRK2013/*Hind* III
- Lane 5 : *Agrobacterium tumefaciens*
- Lane 6 : *Agrobacterium tumefaciens*/*Hind* III
- Lane 7 : Transconjugated *A. tumefaciens*
- Lane 8 : Transconjugated *A. tumefaciens*/*Hind* III
- Lane 9 : Marker (λ *Eco*RI)

streptomycin (100 μ g/ml)의 혼합배지에서 잘 자라 간접적으로 triparental mating이 잘 되었음을 확인할 수 있었다.

Kanamycin과 streptomycin의 혼합배지에 배양한 *Agrobacterium*으로 부터 plasmid DNA를 분리하고 agarose gel electrophoresis로 전개한 결과는 Fig. 5와 6에 나타낸 바와 같다.

pBin19는 *Eco*RI이나 *Hind* III로 처리했을때 같이 한개의 linear form DNA가 동일 위치에 나타나고 있으며 교배시키기 전의 *Agrobacterium*의 plasmid는 *Eco*RI에 의해 많은 조각으로 degradation됨에 반해서 *Hind* III에 의해서 digestion된 흔적이 없었다. 그러나 교배시킨 후의 *Agrobacterium* plasmid에서는 10kb의 band가 관찰되고 *Eco*RI과 *Hind* III처리에 의해서

pBin19과 동일한 위치에서 linear form DNA가 관찰된 것을 볼 수 있는데 이는 pBin19 plasmid가 교배에 의해서 *Agrobacterium tumefaciens*에 들어 갔다는 것을 증명하는 것이다. 한편, helper plasmid (pRK2013)는 *Agrobacterium* plasmid보다 size가 약간 작은 것으로 보였으며 이는 *Agrobacterium* 내에서 replication 되지 못하고 소멸되어서 교배 후 *Agrobacterium* plasmid에서는 관찰되지 않았다.

2. 교배된 *Agrobacterium* 균주의 접종 및 callus 유기

무균적으로 배양된 무우와 배추의 엽육조직에 triparental mating된 균주를 접종하고 2일간 방치한 뒤에 cefotaxime 200ppm, kanamycin 100ppm이 들어있는 배지에서 배양한 결과 15일이 지난 후 세포가 분열함을 알 수 있었다(Fig. 7).

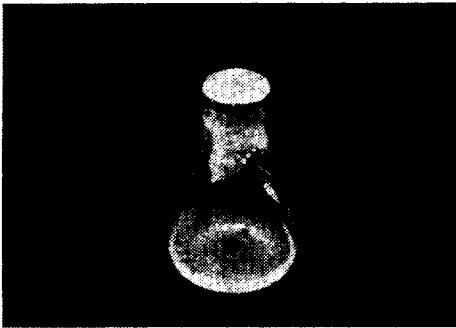


Fig. 7. Callus initiation 15 days after inoculation of radish mesophyll cell with the transconjugated *Agrobacterium tumefaciens*.

적 요

외래 유전자를 식물체내로 도입하여 새로운 형질을 발현시키는 기법은 여러가지가 있는데 본 실험에서는 가장 보편적으로 행해지고 있는 유전자 직접 도입 방식인 electroporation 방법과 *Agrobacterium tumefaciens*법을 통하여 형질전환하기 위해서 필요한 몇가지 조건을 검토했다.

1. 원형질체 분리는 배추는 과종 후 10일, 무우의 경우에는 과종 후 7일째 되었을때 가장 좋은 viability를 나타냈다.

2. 유전자 삽입을 위한 electroporation 최적 조건은 1.77kV/cm, 40μsec에서 생존율 70%, dye 삽입율 58%로 가장 좋았다.

3. electroporation법에 의해서 삽입될 외래 유전자를 vector로 이용하기 위해 pBin19이 갖고 있는 *E. coli* DH5α의 plasmid DNA를 분리 정제하고 전기영동상에서 DNA 크기를 확인하였다.

4. pBin19/DH5α(kanamycin 저항성)와 pRK2013/HB101(kanamycin 저항성), 그리고 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(streptomycin 저항성)를 이용하여 triparental mating시키고 이를 kanamycin과 streptomycin 혼합배지에서 선별 배양함으로써 triparental mating이 이루어 졌음을 일차적으로 확인했을 뿐 아니라 또한 agarose gel 전기영동 결과에서도 재차 확인할 수 있었다.

5. 교배된 *Agrobacterium tumefaciens*로 접종된 식물조직 절편을 cefotaxime 200ppm, kanamycin 100ppm이 든 배지에서 15일간 배양했을 때 세포 분화가 관찰되었다.

참 고 문 헌

Bang, J. W., S. W. Park, S. G. Paik, and Y. J. Kim, 1990. Transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*) by Ti-plasmid vector system (I). *Proc. Mol. Biol. & Genet.* 5, 437-442.
大澤省三, 掘田康雄, 1990. 細胞生物學實驗法, 14-19, 210-213, 廣川書店.
Hwang, S. J., and B. Hwang, 1989. Isolation, culture and electroporation of Rice protoplasts.

Korean J. Bot. 34(1) : 19-23.
James, D. J., A. J. Passey, D. J. Barbara and M. Bevan, 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill) using a disarmed Ti-binary vector, *Plant Cell Reports*, 7 : 658-661.
Manners, J. M., 1987. Transformation of *Stylosanthes* spp. using *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell Reports*, 6 : 204-207.

- Michael W.S., D. Raymond, D. Shillito and I. Negrutiu, 1988. Direct DNA transfer to protoplasts with and without electroporation plant. *Molecular Biology Manual*, A1 : 1-16.
- Nishiguchi, M., T. Sato, and F. Motoyoshi, 1987. An improved method for electroporation in plant protoplasts : Infection of tobacco protoplasts by tobacco mosaic virus particles, *Plant Cell Reports*, 6 : 90-93.
- Park, S.O., E.G. Lee, K.W. Lee., I.K. Ham and Y.B. Lee, 1991. Transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum*) with *Agrobacterium tumefaciens* (II), *Korean J. Plant Tissue Culture*, 18(2). 81-88.
- Planckaert, F. and V. Walbot, 1989. Transgenic gene expression after electroporation of protoplasts derived from embryogenic maize callus, *Plant Cell Reports*, 8 : 144-147.
- Srivastava, V., A.S. Reddy, and S. G. Mukherjee, 1988. Transformation and regeneration of *Brassica oleracea* mediated by an oncogenic *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell Reports*, 7 : 504-507.
- Suh, S.C., H.I., Kim., Y.H. Lee., and T.Y. Chung, 1990. Plant regeneration from the transformed rice protoplasts, *Korean J. Plant Tissue Culture*, 17(3) : 141-150.
- Wolf, H., A. Puhler, and E. Neumann, 1989. Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 30 : 283-289.
- 鈴木裕行, 山本徳男, 1990. 遺傳子 操作의 基本手技, 15-21, 東北大學, 遺傳子 實驗施設編.
- Zhang, H.M., H. Yang, E.L. Rech, T.J. Golds, A.S. Davis, B.J. Mulligan, E.C. Cocking and M.R. Davey, 1988. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts, *Plant Cell Reports*, 7 : 379-384.
- Zimmerman, V. and P. Schurich, 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields, *Planta*, 151 : 26-32.