

고등식물의 유전공학에의 Ti plasmid의 이용

I. 韓國產 *Agrobacterium tumefaciens*로부터의 Ti plasmid의 分離

車潤宗 · 陰眞星 · 洪承範 · 沈雄燮

(高麗大學校 生物學科)

Possible Use of Ti plasmid for Genetic Engineering of Higher Plants.

I. Isolation of Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* in Korea.

Cha, Yoon-Jong, Jin-Seong Eum, Seung-Beom Hong and Woong-Seop Sim.

(Department of Biology, Korea University)

ABSTRACT

In order to obtain Ti plasmid which may be used in genetic engineering of higher plants, virulent *Agrobacterium tumefaciens* were isolated from soil with selective medium.

For their identification, morphological and cultural characteristics were investigated in parallel with physiological and tumorigenesis test.

14 strains were isolated from various regions in Korea. 3 of them were identified as biotype 1 and the others were so heterogeneous that they are not yet conformed to any biotypes.

However, Ti plasmid was isolated from *A. tumefaciens* KU 14 strain, one of the above mentioned 14 strains.

緒 論

*Agrobacterium tumefaciens*는 Smith와 Townsend에 의해 처음으로 보고되었다 (Smith and Townsend, 1907). Bergey's Manual(1974)에 의하면 *Agrobacterium*屬은 *Rhizobiaceae*科에 속하며, *A. tumefaciens*외에 *A. radiobacter*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* 등을 포함한다.

이러한 *Agrobacterium*種들의 구분은 그들이 植物體에 나타내는 毒性의 종류에 근거한 것이며, 최근에는 生理的 特性을 고려하여 biotype을 구분하고 있다(Keane *et al.*, 1970; Kerr and Panagopoulos, 1977; Lippincott *et al.*, 1981).

*A. tumefaciens*는 숙주 식물체에 crown gall을 일으키게 할 수 있으며 이러한 특성은 Ti plasmid에서 기인한다(Van Larebeke *et al.*, 1974; Watson *et al.*, 1975). Ti plasmid는 최소한 93개 科에 달하는 雙子葉植物과 裸子植物(DeCleene *et al.*,

1976)의 體內로 들어가서 轉寫된다는 보고(Chiton *et al.*, 1977; Drummond *et al.*, 1977; Gurley *et al.*, 1979)가 있다. 따라서, 유전공학 실험에 쓸 수 있는 효과적인 유전자 운반체의 개발이 식물의 경우, Ti plasmid를 효과적인 운반체로써 이용하려는 연구가 진행되고 있다(Gurley *et al.*, 1980; Hernalsteens *et al.*, 1980; Holsters *et al.*, 1980).

국내의 연구로는 Lee등(1966a, 1966b, 1967)이 *A. tumefaciens*에 의한 tumor유발에 관하여 보고한 것과 Yoon등(1972)이 tumor조직내에 있는 *A. tumefaciens*에 관해 보고한 것이 있으나, Ti plasmid에 관한 연구는 물론, 韓國產 *A. tumefaciens*의 分離 및 同定에 관한 연구도 미진한 상태에 있다. 본 연구에서는 Ti plasmid를 이용한 유전 공학 실험의 前 段階로서 독성이 있는 *A. tumefaciens*를 分離하고 그 생리적 특성을 조사하여 그들의 biotype을 알아보았으며 나아가서 Ti plasmid를 분리하였다.

材料 및 方法

1. 材料

實驗材料로서, 植物體가 자라고 있는 土壤을 地表의 바로 안쪽에서 멸균한 용기를 사용하여 채취하였다. 토양을 채취한 지역은 서울의 안암동, 연희동 및 경기도의 용문산, 강화도, 전라남도의 두등산, 유달산, 월출산, 경상남도의 삼천포, 오동도, 충무 등지였다.

2. *A. tumefaciens*의 分離 및 同定

1) 選擇培地를 이용한 分離

토양을 멸균증류수로 현탁시켜서 그 상등액을 Schroth등 (1965)의 선택배지에 접종하였다. 배양은 28°C에서 3~4일간 하였으며, 形成된 colony들은 그 특징에 따라 선별한 후 繼代培養하여서, 순순하게 분리된 것을, 4°C에서 Kersters등(1973)의 배지에 영구보존하였다.

2) tumor 形成能 실험

선택배지에서 Colony를 형성한 균주에 대하여 tumor 형성 능력을 조사하였다. 실험 방법은 Anand와 Herberlein(1977)의 것을 사용하였고, 식물재료로서 감자 球根을 사용하였다. 무균적으로 감자 원반을 만들어 1.05% water agar plate에 놓은 다음, 0.8% nutrient broth, 0.5% sucrose, 0.1% yeast extract를 조성으로 하는 배지에서 48시간동안 振蕩培養시킨 배양액을 1개 원반에 대해 0.1ml씩 접종하였다. 27±0.5°C의 暗處에서 10일이상 배양하면서 계속적으로 tumor의 성장을 관찰하였다.

3) 形態的 特性

tumor 形成能 실험에서 tumor 형성 능력을 가진 것이 판명된 균주에 대해 Gram염색을 실시하였으며, De Ley와 Rassel(1965)의 방법에 의거하여 전자현미경(Hitachi HS-7S)으로 細菌의 形態 및 鞭毛를 관찰하였다.

4) 生理的 特性

3-keto락토오스 생성 실험 : Bernaerts와 De Ley(1963)의 방법을 사용하였다.

시트르酸鹽이용에 관한 실험 : Simmons(1926)의 배지에서 28°C로 배양하여 알칼리의 생성을 관찰하였다.

질산염 환원 실험 : Kersters등(1973)의 방법을

참조하였다. 0.1% 질산칼륨을 포함하는 배지에서 28°C에서 배양하여, 1% sulfanilic acid를 포함한 5N acetic acid 용액과 0.6% α -naphthylamine을 포함한 5N acetic acid 용액으로 아질산염의 생성을 조사하였다.

Mannitol, Ca-글리세로 일산 침전 실험 : Hofer(1941)의 방법을 사용하였다.

2% NaCl 耐鹽性 실험 : Graham과 Parker(1964)의 방법을 사용하였다.

리트머스 우유 실험 : Kersters등(1973)의 방법을 사용하였으며, 리트머스 우유 용액은 Holding과 Colee(1972), Smibert와 Krieg(1981)의 방법을 참조하여 115°C에서 10분씩 연속 3일간 멸균한 후 사용하였다.

성장 최대 임계 온도의 조사 : Graham과 Parker(1964)의 실험 방법에 따랐다.

3. Ti plasmid의 分離

분리한 균주들로부터 Ti plasmid를 분리하기 위하여 Casse등(1979)과 Currier와 Nester(1976)의 방법을 사용하였으며 모든 실험 과정은 달리 언급이 없는 한 실온에서 행하였다.

1) DNA의 分離

분리한 균주들 중 실험균주로서 임의로 KU 14 strain을 선택하여 TY(Tryptone 0.5%, yeast extract 0.3%, pH 7.1) 배지에서 29°C의 온도로 지수 성장기의 마지막 단계에 도달하기 직전까지 배양하였다. 배양후 NaCl을 최종 농도가 1M되게 첨가하여 30분 동안 강력하게 흔들어서 원심분리한 다음 그의 침전물을 TE buffer(0.05 M Tris, 0.02M EDTA, pH 8.0)로 2번 세척한 후 침전물 100mg당 0.5ml TE buffer로 현탁시켰다. 현탁액 0.5ml에 대하여 9.5ml lysing buffer(1% SDS를 포함한 TE buffer를 pH 12.4로 조정된 용액)를 첨가한 후, magnetic stirrer를 사용하여 진탕시켜서 34°C에서 25분간 방치하였다. 방치후 2M Tris-Cl buffer, pH 7.0으로 pH를 8.5~8.9로 조정하고 여기에 NaCl을 최종 농도가 3%되게 첨가한 후 다시 30분간 방치하였다. 여기에 3% NaCl용액으로 포화된 phenol을 동일 부피로 첨가하여 원심분리한 후 상층액에 Sodium acetate를 최종 농도가 0.3M되게 첨가하고 다시 2배의 95% ethanol을 부가하여 24시간 동안 -20°C에서 방치하였다. 그 후 원심분

리하여 DNA침전물을 얻은 후 TES buffer(0.05 M Tris, 0.05M NaCl, 5mM EDTA, pH 8.0) 7ml로 현탁시켰다.

2) Cesium chloride-ethidium bromide 밀도구배 원심분리 상기 DNA 표품 7ml에 CsCl 7g을 첨가하여 완전히 용해시키고 여기에 EtBr 용액(10mg EtBr/1mg 증류수)을 0.56ml 첨가하여 Hitachi RP 65-447 rotor에서 36,000rpm으로 50시간 동안 20°C에서 원심분리하였다. 원심분리후 자외선하에서 DNA band를 확인하였다.

結 果

1. *A. tumefaciens*의 特性

1) 形態의 特性

分離된 균주들이 선택배지위에 형성한 colony들의 형태적 특징을 조사한 결과는 table 1과 같다.

각 colony들의 전체 모양과 가장자리의 형태를 보면 모두 원형이며 가장자리는 뚜렷한 경계를 보였으나, 그 외의 다른 특징에서도 차이를 보였다. colony의 색은 균주에 따라서 노랑 내지 붉은오렌지, 노랑 내지 베지, 붉은색 그리고 노랑테두리를 가지는 붉은색등 4가지로 구분되었으며, colony의 표면, 고도 및 투명도를 보면 Ku3과 Ku5만이 다른 균주와는 달리 무광택, 높은 봉우리 모양 그리고 불투명의 특징을 보였다.

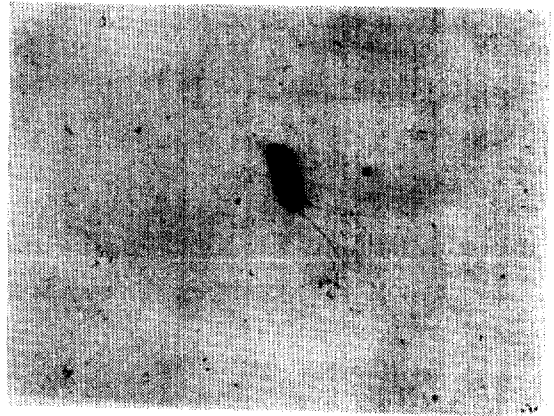


Fig. 1. Electron micrograph of *Agrobacterium tumefaciens*, strain Kul (4,400X).

한편, 선택배지에서 분리된 균주들은 모두 Gram 음성 반응을 나타내었으며, Fig. 1에서 보는 바와 같이 막대모양을 하고 peritrichous flagella를 갖고 있는 것으로 판정되었다.

2) Tumor의 形成能

Tumor는 감자 원반에 균주의 배양액을 접종한지 10일 전후로 나타나기 시작하였으며 그 이후로는 점점 성장하여 완전한 tumor의 모양을 갖추게 되었는데, Fig. 2에 나타난 것은 배양 30일째의 감자원반에 형성된 tumor이며, table 2에 표시된 14균주는 모두 tumor를 형성한 균주들이다.

Table 1. Morphological characteristics of colonies on selective on selective medium.

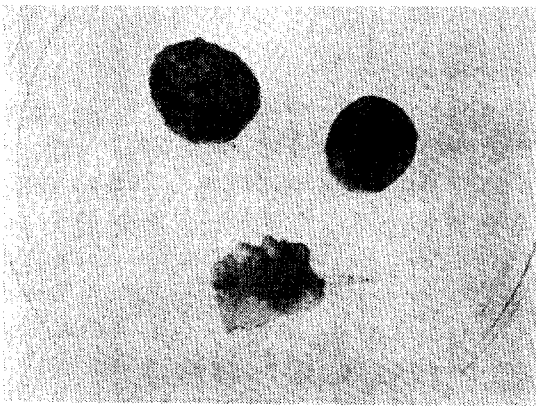
No. of strains	Color	Shape	Surface	Elevation	Margin	Clearness
Ku 1	yellow or salmon	circular	glistening	convex	entire	translucent
Ku 2	yellow or salmon	circular	watery-glistening	convex	entire	translucent
Ku 3	red	circular	not-glistening	raised	entire	opaque
Ku 4	yellow or salmon	circular	glistening	convex	entire	translucent
Ku 5	red	circular	not-glistening	raised	entire	opaque
Ku 6	yellow or beige	circular	glistening	convex	entire	translucent
Ku 7	yellow or salmon	circular	glistening	convex	entire	translucent
Ku 8	red with yellow halo	circular	glistening	convex	entire	translucent
Ku 9	red with yellow halo	circular	glistening	convex	entire	translucent
Ku 10	red with yellow halo	circular	glistening	convex	entire	translucent
Ku 11	red with yellow halo	circular	glistening	convex	entire	translucent
Ku 12	yellow or salmon	circular	glistening	convex	entire	translucent
Ku 13	yellow or salmon	circular	watery-glistening	convex	entire	translucent
Ku 14	yellow or salmon	circular	glistening	convex	entire	translucent

Table 2. Physiological characteristics of isolated strains.

No. of strains	3-keto-lactose formation	Utilization of citrate	Nitrate reduction	Ca-glycero-phosphate precipitation	2% NaCl tolerance	Maximum growth temp.	Litmus milk	
							reaction	serum zone formation
Ku 1	d	d	+	-	+	39°C	Alk	+
Ku 2	+	+	+	-	+	34°C	Alk	-
Ku 3	+	+	-	-	+	34°C	Alk	+
Ku 4	d	+	+	-	+	34°C	Alk	-
Ku 5	+	+	+	-	+	32°C	Alk	-
Ku 6	+	+	+	-	+	39°C	Alk	-
Ku 7	+	+	+	-	+	39°C	Alk	+
Ku 8	+	d	+	-	+	32°C	Alk	-
Ku 9	+	+	+	-	+	32°C	Alk	-
Ku 10	+	d	+	-	+	32°C	Alk	+
Ku 11	d	+	-	-	+	34°C	Alk	+
Ku 12	+	d	+	-	+	34°C	Alk	+
Ku 13	+	+	+	-	+	34°C	Alk	+
Ku 14	+	+	+	-	+	39°C	Alk	+

d : doubtful

Alk : Alkaline reaction

**Fig. 2.** Potato discs with tumors after 30 days of incubation.

3) 生理的 特性

分離한 균주들의 생리적 특성을 조사한 결과는 table 2와 같다. Table 2에서 보는 바와 같이 Ca-글리세로인산 침전 실험, 2% 耐鹽性 실험에 대해서는 반응이 동일하게 나타났으나, 그 외의 실험에 대해서는 차이를 보였다. 분리된 14개의 균주중에서 3-keto 락토오스 생성 실험에 대해서는 11개가, 시트르酸鹽 이용에 관한 실험에서는 10개가 각각 양성반응을 보였다. 질산염 환원 실험에서는 12개가 양성반응을 보였으며 그 외의 균주들은 음성반응을 나타내었다.

2. Plasmid의 분리

Ku14균주로부터 분리된 DNA 표품을 CsCl 밀도구배 원심분리한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 2개의 band를 얻었는데, 그중 아래 것이 Ti plasmid에 해당되는 것이다.

考 察

*Agrobacterium*屬의 모든 균주들은 생리 및 생화학적 특성에 근거하여, biotype 1, 2, X의 3가지 중 어느 하나에 속하게 되는데, biotype X의 경우는 biotype 1과 2의 어느 것에도 속하지 않는 중간적인 특성을 가진 균주들로 구성된다 (Kerstens *et al.*, 1973; Panagopoulos and Psallidas, 1973; Kerr and Panagopoulos, 1977; Lippincott *et al.*, 1981).

*A. tumefaciens*의 경우는 이 3가지 biotype의 균주들이 모두 포함되고 있다(Lippincott *et al.*, 1981).

본 실험에 사용한 선택배지에서는 *A. tumefaciens*와 *A. radiobacter*의 균주들이 분리되는데 (Schroth *et al.*, 1965), 특히 biotype 1의 균주들이 분리된다(Lippincott *et al.*, 1981). 본 실험에서 관찰한 바로는, 선택배지에서 분리한 균주는 1개를 제외하고는 모두 crown gall을 형성할

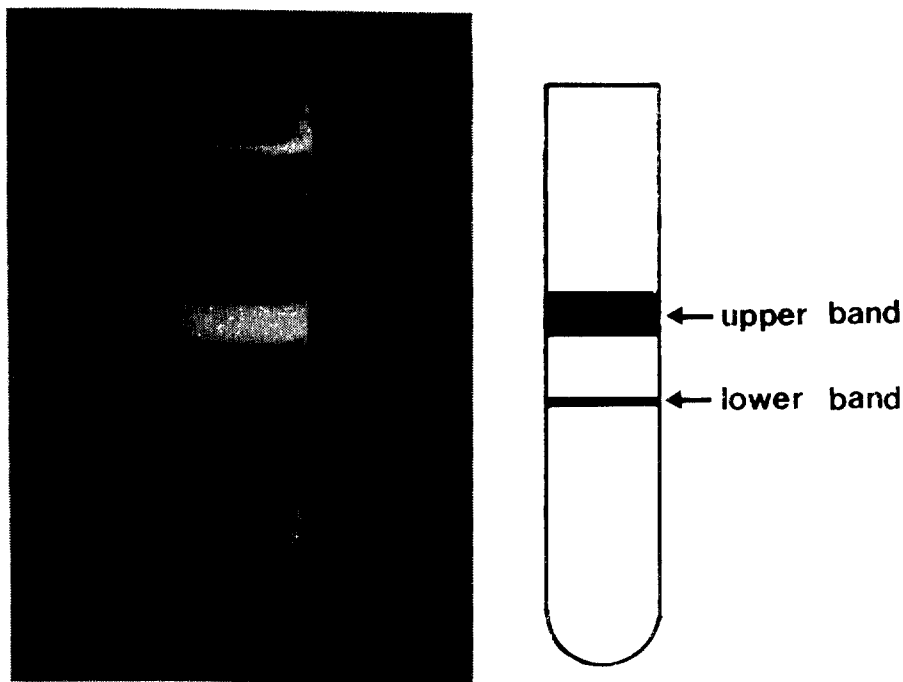


Fig. 3. Two bands after CsCl density gradient centrifugation. They were observed under long wave UV light.

수 있었으며, 나머지 1개는 감자 원반을 부패시키는 현상을 보였는데, 이러한 특성은 Lippincott 등(1981)의 보고에 따르면 *A. radiobacter*의 특성에 해당된다.

Lippincott 등(1981)은 Schroth 등(1965)의 선택 배지에서 *A. rhizogenes*와 *A. rubi*가 성장할 수 없다고 보고하였으며, 본 실험에서도 이 두 종의 특성인 hairy root와 cane gall을 형성할 수 있는 균주는 발견되지 않았다. 따라서, *A. tumefaciens*를 다른 종들의 오염없이 순수하게 분리하는 데에는 Schroth 등(1965)의 선택배지가 적당한 것으로 생각된다.

균주 분리에 사용한 토양 표본은 전국 11개 지역에서 채취한 것으로, 모든 표본에서 *A. tumefaciens*를 분리할 수 있었다. 이러한 결과는 *A. tumefaciens*가 토양 중에 흔한 미생물이라는 Lippincott 등(1981)의 보고와 일치하는 것이며, *A. tumefaciens*가 경제작물에 일으키는 crown gall이 심각한 문제로 대두되고 있는 외국의 경우(Lippincott *et al.*, 1981)에 비추어 볼 때 국내에서도 이에 관한 연구가 있어야 할 것이다.

분리한 *A. tumefaciens*의 일부 균주는 색소를 형성할 수 있는 능력이 확인되었는데(결과에 표

시 안됨) 이러한 사실은 이전에는 언급되지 않은 것으로, 그러한 능력의 획득이 어떻게 일어난 것인가에 대한 연구가 필요하리라고 본다.

또한, tumor 형성 실험의 결과, tumor의 출현 시기 및 tumor의 갯수가 균주에 따라 다소 차이가 있었는데, 이러한 사실은 Anand와 Herberlein(1977)도 보고한 바 있다. 본 실험에서는 tumor의 형성 여부에 중점을 두었으므로, 이에 관한 정확한 결과는 산출하지 않았다.

tumor형성 실험을 통해 tumor를 형성할 수 있음이 확인된 균주들에 대해 전자현미경으로 관찰한 결과는 Kersters 등(1973), Bergey's Manual(1974)에서 밝힌 바와 같다.

한편, biotype 1의 특징으로는 3-ketolactosyl 생성실험에서는 양성반응을, 리트머스 우유 실험에서는 알칼리 반응을 나타내며(Keane *et al.*, 1970; Panagopoulos and Psallidas, 1973; Bergey's Manual, 1974), 시트르산염 이용 실험에서는 대부분 음성반응을 보이거나 일부는 양성반응을 보인다고 하였다(Keane *et al.*, 1970; Panagopoulos and Psallidas, 1973; Lippincott *et al.*, 1981).

또한 질산염 환원 실험에서는 대부분의 균주가 양성반응을 보이며, 2% 耐鹽性 실험에서는

모두 양성반응을 보인다고 하였다(Panagopoulos and Psallidas, 1973; Lippincott *et al.*, 1981).

Panagopoulos와 Psallidas(1973), Lippincott등(1981)은 *Agrobacterium*屬의 성장 최대 임계 온도가 29°C인 것을 biotype 2라 하였고, 33~35°C인 것을 biotype X라 하였으며, 37~38°C인 것을 biotype 1이라 하였다.

그런데, 본 실험의 Ku6, Ku7 및 Ku14의 3 균주는 모두 성장 최대 임계 온도가 biotype 1에 가까운 39°C이었으며, 그 외의 생리적 특성이 위에서 언급한 biotype 1의 특징과 일치하였으므로 이 3 균주를 biotype 1으로 동정하였다. 한편, 그 외의 11개 균주들은 biotype 1에 가까우나, 3-ket락토오스 생성 실험과 성장 최대 임계 온도의 조사 결과, 상반된 결과를 보이므로 본 실

험에서는 이들의 명확한 biotype의 구분은 하지 않았다.

한편, 세균의 염색체 DNA와 plasmid DNA를 혼합하여 CsCl-ethidium bromide 밀도 구배 원심 분리를 시키면 두 DNA의 buoyant density 차로 말미암아 염색체 및 open circular DNA는 위에, 그리고 plasmid DNA는 그 아래에 band를 형성할 뿐만 아니라(Currier and Nester, 1976; Casse *et al.*, 1979), Ku14 균주가 crown gall을 형성할 수 있음이 본 실험에서 확인되었고 이러한 특성이 Ti plasmid에서 기인한다는 보고(Van Larebeke *et al.*, 1974; Watson *et al.*, 1975)에 따라 Fig.3의 아래 band는 Ti plasmid DNA로 구성된 것으로 판단하였다.

摘 要

Ti plasmid를 고등 식물의 유전자 운반체로서 이용하기 위하여, Ti plasmid를 갖고 있는 *Agrobacterium tumefaciens*를 選擇培地를 이용하여 전국 각지의 土壤으로부터 분리하였다. 분리된 *A. tumefaciens*는 tumor 形成能 실험, 形態的 特性, 培養的 特性, 生理的 特性에 의하여 同定하였다. 그 결과, 14 균주의 毒性 *A. tumefaciens*를 분리할 수 있었고 이 중 3개의 균주는 biotype의 구분이 명확하지 못했다.

한편, 분리된 14개 strain의 毒性 *A. tumefaciens*中的 하나인 Ku14 strain으로부터 Ti plasmid를 분리하였다.

引 用 文 獻

1. Anand, V.K., and G.T. Herberlein, 1977. Crown gall tumorigenesis in potato tuber tissue. *Amer. J. Bot.* 64(2), 153-158.
2. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1974. 8th edn.
3. Bernaerts, M.J., and J. De Ley, 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* 197, 406-407.
4. Casse, F., C. Boucher, J.S. Julliot, M. Michell, and J. Denarie, 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, 113, 229-242.
5. Chilton, M.D., M.H. Drummond, D.J. Merlo, D. Sciaky, A.L. Montoya, M.P. Gordon, and E.W. Nester, 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11, 263-271.
6. Currier, T.C., and E.W. Nester, 1976. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Ann. Biochem.*, 76, 431-441.
7. DeCleene, M., and J. De Ley, 1976. The host range of crown gall. *Botanical Review* 42, 389-466.
8. De Ley, J., and A. Rassel, 1965. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 41, 85-91.
9. Drummond, M.H., M.P. Gordon, E.W. Nester, and M.D. Chilton, 1977. Foreign DNA of bacterial plasmid origin is transcribed in crown gall tumors. *Nature* 269, 535-536.
10. Graham, P.H., and C.A. Parker, 1964. Diagnostic feature in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant and Soil* 20, 38E-39E.
11. Gurley, W.B., J.D. Kemp, M.J. Albert, D.W. Sutton, and J. Callis, 1979. Transcription of Ti-plasmid derived sequences in three octopine-type crown gall tumor lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- 76, 2828-2832.
12. Gurley, W.B., J. Callis, and J.D. Kemp, 1980. Crown gall transcription of Ti plasmid-derived sequences. In: C.J. Leaver ed. *Genome Organization and Expression and Expression in Plants*. Plenum Press. New York and London, pp.481-488.
 13. Hernalsteens J-P., F. Van Vliet, M. De Beuckeleer, A. Depicker, G. Engler, M. Lemmers, M. Holsters, M. Van Montagu, and J. Schell, 1980. The *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature*, London 287, 654-656.
 14. Hofer, A.W. 1941. A characterization of bacterium *radiobacter* (Beijerinck and Van Delden) Löhnis. *J. Bacteriol.* 41, 193-224.
 15. Holding, A.J., and J.G. Collee, 1972. Routine biochemical tests. In: J.R. Norris and D.W. Ribbonsed. *Methods in microbiology*. vol 6A. Academic Press. London and New York, pp. 1-32.
 16. Holsters, M., B. Silva, F. Van Vliet, C. Gentello, M. De Block, P. Dhaese, A. Depicker, D. Inze, G. Engler, R. Villarroel, M. Van Montagu, and J. Schell, 1980. The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* 3, 212-230.
 17. Keane, P.J., A. Keer, and P.B. New, 1970. Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.* 23, 585-595.
 18. Kerr, A., and C.G. Panagopoulos, 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathol. Z.* 90, 172-179.
 19. Kersters, K., J. De Ley, P.H. A. Sneath, and M. Sackin, 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 78, 227-239.
 20. Lee, M.J., S.W. Hong, and Y.K. Choi, 1966a. Studies of plant tumor induction (Part 1) : Experiments on the inoculation of *Agrobacterium tumefaciens* in out field. *Kor. J. Microbiol.* 4(2), 1-4.
 21. Lee, M.J., S.W. Hong, and Y.K. Choi, 1966b. Studies of plant tumor induction (Part 2) : On the study of peroxidase activities of tumor tissues developed on tomato stem in outdoor conditions. *Kor. J. Microbiol.* 4(2), 5-10.
 22. Lee, M.J., S.W. Hong, and Y.K. Choi, 1967. Studies of plant tumor induction (III) : Antimicrobial action of some bacteriacidal agents to obtain bacteria-free tumor tissue. *Kor. J. Microbiol.* 5 (2), 55-59.
 23. Lippincott, J.A., B.B. Lippincott, and M.P. Starr, 1981. The genus *Agrobacterium*. In: Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balowo, and H.G. Schlegel ed. *The Prokaryotes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp.842-855.
 24. Panagopoulos, C.G., and P.G. Psallidas, 1973. Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith and Townsend) Conn. *J. Appl. Bact.* 36, 233-240.
 25. Schroth, M.N., J.P. Thompson, and D.C. Hildebrand, 1965. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens-A. radiobacter* group from soil. *Phytopathology* 55, 645-647.
 26. Simmons, J.S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of the typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J. of Infectious Disease* 39, 209-214.
 27. Smibert, R.M., and N.R. Krieg, 1981. General characterization. In: P. Gerhardt et al. ed. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology. pp.409-443.
 28. Smith, E.F., and C.O. Townsend, 1907. A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.
 29. Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van Den Elsacker, I. Zaenen, R.A. Schilperoort, and J. Schell, 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170.
 30. Watson, B., T.C. Currier, M.P. Gordon, M-D. Chilton, and E.W. Nester, 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bact.* 123, 255-264.
 31. Yoon, K.S., M.J. Lee, S.W. Hong, and Y.C. Hah, 1972. Electron microscope study on *Agrobacterium tumefaciens* in tomato tumor. *Kor. J. Microbiol.* 10, 41-50.