

당근 절편을 이용한 *Agrobacterium* spp. 분리, 동정과 선발균주에 의한 연초의 형질전환

양덕춘 · 양덕조* · 최광태
한국인삼연초연구소, 충북대학교생물학과*

Isolation and identification of *Agrobacterium* spp. using carrot disc and transformation of *Nicotiana glauca* by selected strains

D. C. Yang, D. C. Yang* and K. T. Choi

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345
Dept. of biology, Chung-buk National University, Chungju 360-763*

ABSTRACT

These studies were carried out to obtain the transformant from tobacco cells by *Agrobacterium* spp. from crown gall and soil at the natural field in Korea, and identified their virulence. Kado's and Clark's selective media were used for isolation of *Agrobacterium* spp. In these media, total of 99 strains were characterized based on the morphological characteristics of colonies. Among them 34 strains were able to induce on carrot discs. And hypervirulent strains C23-1 and K29-1 were identified as *Agrobacterium tumefaciens* biotype 1 and biotype 2, respectively. These strains formed fast growing, larger gall as compared to those induced by other strains on the carrot discs. Transformed tobacco callus was initiated on the phytohormone free MS medium with 250 μ g/ml carbenicillin after co-cultivation of tobacco stem explants and *Agrobacterium*. On the phytohormone free media, shoot was rarely formed from transformed callus. However, these shoot were teratoma shoots which were not grown as normal shoot, and teratoma shoot from transformant by C23-1 was smaller than that of K29-1.

서 론

식물세포의 형질전환용 운반체로서는 자연상태에서 crown gall을 유발하는 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti-plasmid가 가장 많이 연구되고 있다^{8, 13, 14, 15}.

Ti-plasmid는 T-DNA라는 유전물질을 virulence re-

gion의 도움을 받아 식물세포의 핵내로 삽입시켜 형질전환을 유도하는데 형질전환된 식물체는 T-DNA 내에 배열되어 있는 유전자의 발현으로 식물호르몬을 과다 분비하며¹⁾, 정상식물체에는 거의 발견되지않은 opine 이라는 아미노산 유도체를 생산하게 된다¹¹⁾. 이런 원리는 자연상태에서 미생물의 유전자가 식물세포의 염색체에 융화되어 발현된 형질전환의 가장 대표적인 예로서 외부유전자를 식물세포내로 도입할

수 있는 계기를 제공해준 셈이 된다.

자연상태에서 존재하는 *Agrobacterium* spp. 로써는 *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. radiobacter* 등이 있으며, 종아래 biotype을 합쳐 모두 7개의 균주가 보고되어 있으나²⁾, 유전적인 유사성이 매우 근연인 관계에 있기 때문에 분리 및 동정에 상당한 어려움이 있다. *Agrobacterium* spp. 선택배지로써는 다량의 항생제가 첨가된 Schroth^{3,4,12)}과, New and Kerr¹⁰⁾가 개발한 배지가 보고되어 있으며, 또한 항생제를 사용하지 않고도 탄소원을 이용해서 선택할 수 있는 Kado와 Clark배지가 개발되어 있다^{7,9)}.

따라서 본실험은 다량의 항생제를 사용하지 않고 *Agrobacterium* spp. 를 선별할 수 있는 Kado⁹⁾ 와 Clark⁷⁾배지를 이용해서 국내 숙주식물에 형성된 tumor조직과 근권토양으로 부터 형질전환율이 높은 *Agrobacterium* spp. 를 분리, 동정하여 선별된 *Agrobacterium* strains를 이용하여 연초조직을 형질전환 코자 수행하였다.

재료 및 방법

자연산 *Agrobacterium* spp. 의 분리

자연산 *Agrobacterium* spp. 를 분리하기 위해서 멸균된 Petri-dish에 자연적으로 형성된 gall조직과 근권토양을 채취하여 멸균증류수에서 10%의 현탁액을 만든다음 1일동안 진탕하였다. 진탕액을 filter paper로 여과하여 여과액 0.1ml를 Kado⁹⁾ 및 Clark⁷⁾의 선택배지에 도말하여 배양하면서 형성된 colony들의 특성에 따라 분리한후 YEB(Beef extract 5.0g/l, peptone 5.0g/l, yeast extract 1.0g/l, sucrose 5.0g/l, MgSO₄ 0.406g/l, pH 7.1)배지에 증식시켜 동정하였다.

당근 disc를 이용한 crown gall의 형성

식물호르몬 무첨가 water agar plate(1.5%)에 carbenicillin 250 μ g/ml를 첨가하여 멸균된 당근 disc를 0.5cm 두께로 절단한 후 치상하였다. 당근의 소독은 깨끗한 물로 세척하고 70%의 ethanol에서 3분간 담

근후 2%의 NaOCl에서 20분간 침지하여 멸균증류수로 3회 세척하였다. 치상된 당근 disc위에 1일간 YEB배지에서 배양된 분리한 균주의 현탁액 0.1ml를 도말하여 25 $^{\circ}$ C의 배양실에서 배양하면서 crown gall의 형성여부를 관찰하였다.

분리된 *Agrobacterium* spp. 의 동정

분리된 균주중에서 당근 disc위에서 gall을 형성한 균주를 선택하여 Bergey's manual²⁾에 의해 동정을 실시하였다

동정된 *Agrobacterium* spp. 항생제 내성 조사

동정된 *Agrobacterium* spp. 의 항생제 내성정도를 조사하기 위해서 kanamycin, G418과 chloramphenicol이 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100 μ g/ml 첨가된 배지에, 그리고 tetracycline이 0, 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100 μ g/ml 첨가된 배지에 *Agrobacterium* spp. 를 접종하여 생존율을 조사하였다.

선발균주에 의한 연초의 형질전환

선발된 *Agrobacterium tumefaciens* C23-1과 K29-1 균주에 의해 *Nicotiana glauca* 조직을 형질전환시키기 위해서 연초줄기를 1% NaOCl로 소독한후 0.8cm 길이의 절편을 만든 다음 절편의 여러군데에 칼로 상처를 주었다. 한편 YEB배지에서 1일 동안 배양된 2종의 *Agrobacteria* 균주의 현탁액 1ml를 채취하여 5ml의 식물호르몬 무첨가 Murashige and skoog(MS) 배지에 혼합하고 연초 줄기절편과 1일동안 동시배양한 후 MS배지로 3회 세척하고나서 250 μ g/ml의 carbenicillin이 첨가된 MS배지에 접종하여 25 $^{\circ}$ C의 배양실에서 배양하면서 callus의 형성여부를 조사하였다. 형성된 callus는 3회 더 동일배지에서 계대배양한 후 *Agrobacteria*가 완전히 제거되었을때 carbenicillin이 첨가되지 않은 MS기본배지에서 배양하였다. 또한 계대배양동안 형성된 teratoma shoot를 배양하면서 형태적 특성을 조사하였다.

결과 및 고찰

자연산 *Agrobacterium* spp.의 분리 및 동정

국내의 임야에서 자연적으로 형성된 gall조직을 조사한 결과 주로 *Populus* spp.에서 많이 발견되었으며, *Malus* spp., *Salix* spp.등에서도 관찰되었다 (Fig. 1).

각 수종에서 형성된 crown gall 조직과 근권토양들을 채취하여 멸균증류수 10%의 현탁액을 만든다음 현탁액을 Kado⁹⁾와 Clark⁷⁾의 *Agrobacterium* spp.의 선택배지에 도말한 결과 배양 3일만에 균생장이 모두 잘 되었다. 그러나 fungi등에 의한 오염이 심한편이었으며, 빨간색의 곰팡이와 하얀색의 곰팡이들이 많이 관찰되었다. 형성된 colony중에서 특성에 따라 Kado배지에서 51균주를 분리하였으며, Clark 배지에서 48균주를 분리하였다(Table 1). 선택배지에서 분리된 총 99균주는 다시 동일배지에서 3회를 더 계대배양하여 완전한 단일 colony로 만든다음 4°C에 보관하여서 다음실험에 사용하였다. 우선 분리된 균

주들로부터 gall형성여부를 확인한후 동정하기 위해서 YEB배지에서 1일간 배양한후 당근disc위에 균현탁액을 도말하여 carbenicillin이 250 μ g/ml 첨가된 water agar plate에 치상하여 gall의 형성여부를 조사한 결과 일부 균주에는 Fig. 2.에서 보는 바와 같이 gall이 당근 disc위에 형성되었다. 그러나 선발배지에 따라 gall형성율에 차이가 있었는데 Kado배지에서는 분리한 51균주중 19균주에는 gall이 형성되었으며 Clark배지에서 분리한 48균주중에서는 15균주가 gall을 형성하였다(Table 1). 한편 당근 disc위에서 gall이 형성된 시기와 gall의 크기때문에 virulence로 구분하여 gall의 형성이 빠르고 크기가 큰정도에 따라 hyper, high, medium, slow로 구분하였던바, Kado배지에서는 hyper균주가 1종, high균주가 3종 조사되었으며, Clark배지에서는 hyper균주가 2종, high균주가 3종 조사되었고, 나머지 25균주는 medium 및 slow상태를 나타내었다(Table 1). 분리한 균주의 gall형성율에 의해서 선발배지의 *Agrobacterium* spp. 분리 수율을 조사한 결과 분리한 균주중에서, Kado의

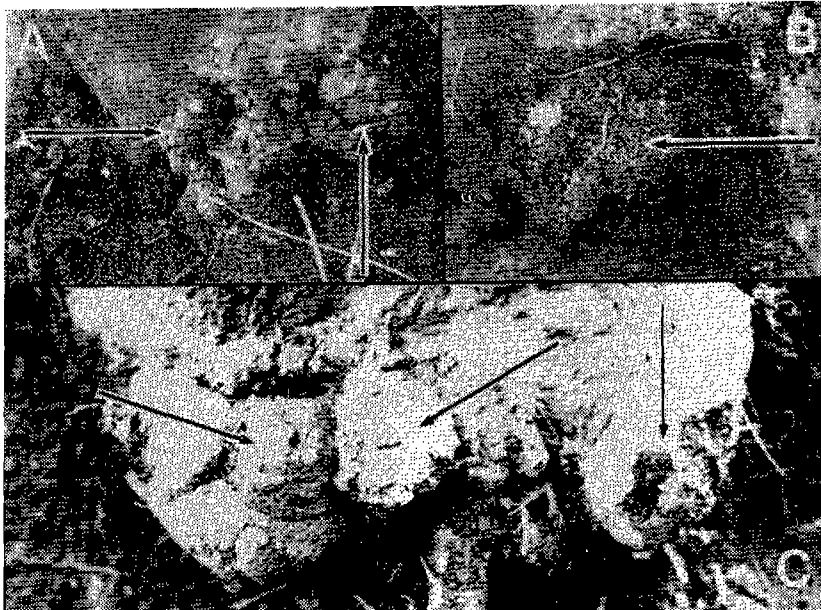


Fig. 1. Galls(←) induced from infection of *Populus* spp. (A), *Salix* spp. (B) and *Malus* spp. (C) by *Agrobacteria* in the natural field.

선발배지의 경우에는 37%, Clark배지에서는 31%가 *Agrobacterium* spp.로 나타나 Kado배지가 Clark배지보다 *Agrobacterium* spp. 선발에 다소 수율이 높은것으로 나타났다(Table 1).

Tumor의 형성된 균주들의 선택배지위에서 크기와 형태를 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 선택배지에 따라서 색깔이 다양하게 나타났는데, Kado배지에서는 white, yellow, 그리고 black blue가 주종을 이루고 다른 색깔도 관찰되었으나, Clark배지에서는 대부분 white이었으며, yellow색깔도 관찰할 수 있었다. 균주의 크기는 대부분 0.2-4mm 정도이었고 형태는 ci-

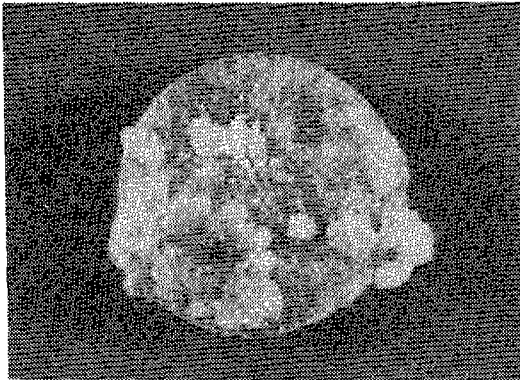


Fig. 2. Galls induced on carrot disc by infection of *Agrobacteria* strain isolated in soil.

rcular, glisten 상태를 나타내었으며 투명도는 Kado 배지에서 translucent와 opaque상태가 주류를 이루고 있었다(Table 2). Kado⁹⁾의 보고에 의하면, 동일 배지상에서 colony의 형태가 본연구와 같이 circular, convex, glistening상태를 보고하였으나, 색깔은 처음에 light blue에서 dark green으로 나타난다고 보고하여 본연구 결과와 다소 다르게 보고되어 있으나, 이것은 선택배지내에 bromothymol blue가 첨가되어 있어 dark blue 상태로 보이기도 하고, 또한 *Agrobacterium* spp.가 배지내에 들어있는 mannitol을 이용하여 산을 분비하므로써 색깔이 노란색으로 변화되기 때문에²⁾ 관찰자에 따라 colony의 색깔을 다소 다르게 구분 할수 있을것으로생각된다. 선택배지에서 colony의 형성시기는 본연구에서는 3일이 경과하면 많은 colony가 형성되었으나 Clark⁷⁾은 4-7일 사이에 colony가 형성된다고 보고하였다. 한편 분리한 균주들을 당근disc위에서 gall의 형성여부를 관찰한후에 동정한 이유는 Bergey's manual²³⁾에 의하면 *Helianthus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota* 등의 식물체에 *Agrobacterium* spp.를 감염시켜 gall의 형성여부에 따라서 종간 및 biotype를 결정할 수 있다고 하였으며, 특히 당근disc위에서는 *A. rhizogenes* biotype 2에서는 gall도 형성되지만 hairy root도 형성된다고 하였고, *A. tumefaciens* 및 *A. rubi*는 gall만이

Table 1. Gall formation on carrot disc infection of *Agrobacterium* spp. isolated by selective media from soil and crown gall

	Selective media	
	Kado	Clark
Number of total isolate(I)	51	48
Number of strains formed gall(G)	19	15
Ratio(%) (G/I)	37	31
Virulence :		
(Number of strains)		
Hyper	1	2
High	3	3
Medium	13	8
Slow	2	2

당근 절편을 이용한 *Agrobacterium* spp. 분리, 동정과
선발균주에 의한 연초의 형질전환

Table 2. Morphological characteristics of colonies isolated on the selective media

selective Media	Strains	Color	Size (mm)	Surface	Clearness
Kado medium	K1-1	White	0.5	Glisten	Translucent
	K3-1	yellow	4.0	Watery glisten	Opaque
	K3-2	White	4.0	Watery glisten	Translucent
	K5-1	Black blue	0.2	Glisten	Opaque
	K10-2	White	0.5	Watery glisten	Opaque
	K10-4	Orange	0.5	Watery glisten	Translucent
	K11-1	Orange	0.5	Glisten	Translucent
	K11-3	Black blue	0.2	Glisten	Opaque
	K21-1	Black blue	0.5	Glisten	Opaque
	K21-2	White	2.0	Glisten	Translucent
	K21-3	Redish brown	0.5	Glisten	Opaque
	K23-1	White	2.0	Glisten	Translucent
	K24-2	Yellow	4.0	Glisten	Translucent
	K24-4	Black blue	0.5	Glisten	Translucent
	K24-5	White	0.2	Watery glisten	Translucent
	K26-1	White	4.0	Glisten	Translucent
	K27-1	White	2.0	Watery glisten	Translucent
	K27-2	Black blue	0.5	Glisten	Opaque
	K29-1	White	2.0	Glisten	Opaque
	Clark medium	C3-1	White	4.0	Watery glisten
C3-3		White	3.0	Glisten	Opaque
C4-1		White	2.0	Glisten	Translucent
C6-1		White	4.0	Watery glisten	Translucent
C10-1		White	0.2	Glisten	Translucent
C11-1		White	2.0	Glisten	Translucent
C21-1		White	4.0	Glisten	Translucent
C21-4		White	4.0	Watery glisten	Translucent
C22-2		White	0.5	Glisten	Translucent
C23-1		White	2.0	Glisten	Translucent
C25-1		Yellow	0.5	Glisten	Opaque
C26-2		White	3.0	Glisten	Translucent
C27-1		White	3.0	Glisten	Translucent
C27-3		White	0.5	Glisten	Translucent
C29-1		Yellow	2.0	Glisten	Opaque

형성하는 것으로 보고되어 있어, 본실험의 목적상 분리된 균주를 가지고 당근:disc위에서 gall 및 hairy root의 형성여부를 관찰하여 non-virulent균주는 제거하고 gall을 형성하는 *Agrobacterium* spp. 만 가지고 동정 하고자 하였다.

한편 당근 disc위에서 gall의 형성기시가 빠르고 크기가 큰 관계로 hyper virulent 균주로 분류한 K29-1, C23-1, C29-1 3종과, high virulent균주로 분류한 K23-1, K23-4, K27-1, C3-2, C11-1, C21-1 6종과 가장 많이 알려진 *Agrobacterium tumefaciens* C58균주를 대상으로 해서 Bergey's manual에 의해서 동정 했다.

우선 35°C의 온도에서 생존여부를 조사한결과 K23-1, K24-4, K27-1, C11-1, C21-1, C23-1과 C58이 생존하였으며, 2%의 고농도인 NaCl에서의 생존여부를 조사한 결과 선발한 모든 균주가 생존하였다. K29-1과 C29-1은 erythritol을 이용하여 산을 생성하였으며, C3-2, C11-1, C23-1은 C58과 함께 melezitose를 이용하여 산을 생성하였다. 또한 K23-1, K24-4, K29-1, C3-2, C11-1, C29-1은 citrate를 이용하여

알카리를 생성하였으며, K27-1, C21-1, C23-1은 C58과 같이 lactose를 이용해서 3-ketolactose을 생성하였다. 이런 화학적 및 생리적 특성을 조사한 결과를 토대로하여 Bergey's manual²⁾에 의거해서 동정한바, K27-1, C21-1, C23-1은 *Agrobacterium tumefaciens* biotype 1으로 그리고 K29-1과 C29-1은 *Agrobacterium tumefaciens* biotype 2로 판단되었지만 다른 균주는 생리적인 특성이 다소 다르게 나타나 구별하기가 어려웠다.

한편 gall의 형성이 왕성했던 hyper virulent균주인 K29-1, C23-1과 C29-1을 대상으로 항생제인 kanamycin, G418, chloramphenicol과 tetracycline에 대한 내성을 조사하였던 바, K29-1과 C29-1은 항생제에 대한 반응이 매우 비슷하였으며, 생화학적 동정결과 생리적 특성이 같으며 또한 균주분리시에도 선택배지만 다르게 사용하였을뿐 같은 숙주식물에서 채취한 gall조직을 사용하여 접종하였기 때문에 동일 균주인 것으로 사료되었다. 특히 2균주의 항생제 내성정도를 비교한 결과, K29-1은 kanamycin에 대해서 매우 내성을 나타내고 있어 100µg/ml에서도 생장이 가능하였

Table 3. Identification of *Agrobacterium* spp. by physiological characteristics

Strains	Growth		Formation of acid		Formation of alkali		Production of
	at 35°C	in 2% NaCl	Erythritol	Melezitose	Citrate	Tartrate	Ketolactose
K23-1	+	1	-	-	+	d	-
K24-4	+	+	-	-	+	+	-
K27-1	+	+	-	-	-	+	+
K29-1	-	+	+	-	+	d	-
C3-2	-	+	-	+	+	d	-
C11-1	+	+	-	+	+	d	-
C21-1	+	+	-	-	-	+	+
K23-1	+	+	-	+	-	d	+
K29-1	-	+	+	-	+	d	-
K58	+	+	-	+	-	d	+

d : difficult to confirm, + : positive, - : negative

당근 절편을 이용한 *Agrobacterium* spp. 분리, 농정과
선발균주에 의한 연초의 형질전환

다. Kanamycin과 같은 그룹의 aminoglycoside인 G-418에 대한 내성 정도는 K29-1은 20 μ g/ml에서도 생장이 가능하였고, C23-1은 50 μ g/ml 이상에서는 전혀 성장되지 않았다. Chloramphenicol의 경우에는 K29-1은 40 μ g/ml, C23-1은 30 μ g/ml에서부터 성장되지 않았다. Tetracycline에서는 K29-1의 경우 10 μ g/ml, C23-1의 경우에는 5 μ g/ml까지는 생장이 가능하였으나 그이상의 농도에서는 생장이 되지 않았다. 그래서

Agrobacterium strain K29-1과 C23-1을 연초의 형질 전환에 사용하고자 하였으며, 2종류의 균주를 각각 *Agrobacterium tumefaciens* K29-1 biotype 2로 그리고 *Agrobacterium tumefaciens* C23-1 biotype 1으로 동정하였다.

선발균주에 의한 연초의 형질변환

동정된 자연산 *Agrobacterium tumefaciens* K29-1과 C23-1 균주를 이용하여 연초조직을 형질전환시키

Table 4. Growth of *Agrobacterium* spp. on the media with various antibiotics

Strains	Conc. of kanamycin(μ g/ml)								
	0	5	10	20	30	40	50	70	100
K29-1	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	+
K23-1	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
K29-1	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	+	+
Strains	Conc. of G418(μ g/ml)								
	0	5	10	20	30	40	50	70	100
K29-1	++++	+++	++	++	-	-	-	-	-
K23-1	++++	+	-	-	-	-	-	-	-
K29-1	++++	+++	++	++	-	-	-	+	+
Strains	Conc. of chloramphenicol(μ g/ml)								
	0	5	10	20	30	40	50	70	100
K29-1	++++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
K23-1	++++	++++	++++	+++	-	-	-	-	-
K29-1	++++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
Strains	Conc. of tetracycline(μ g/ml)								
	0	1	2	5	7	10	20	30	100
K29-1	++++	++++	++++	++++	++++	+	-	-	-
K23-1	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-	-
K29-1	++++	++++	++++	+++	+++	-	-	-	-

- : Negative growth, +, ++, +++, +++++ : slight, good, well and excellent growth, respectively.

기 위해서 줄기절편을 균주와 함께 동시배양법에 의해서 처리한 후 균주를 제거하기 위해서 carbenicillin이 250 μ g/ml 첨가되었고 반면에 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 MS배지에 접종한 결과 두균주 공히 접종 15일이 경과한 후에는 callus가 형성되었다. 그러나 시간이 경과할수록 사용한 *Agrobacteria*에 의한 오염율이 높았으므로 접종 20일경 부터는 오염되지 않고 callus가 약간이라도 형성된 줄기절편을 carbenicillin이 함유된 새로운 배지에 계대배양한것이 형질전환율을 높이는데 효율적으로 생각되었다.

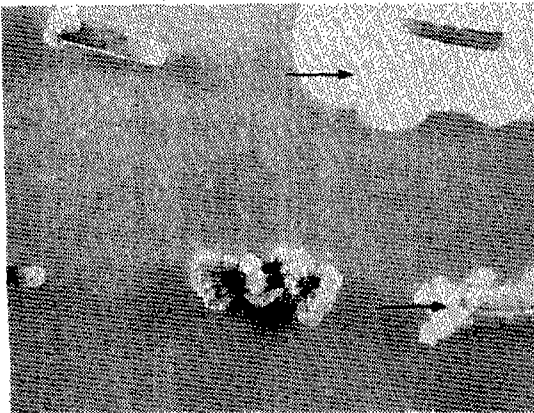


Fig. 3. Callus induction from *Nicotiana glauca* stems on the phytohormone free MS medium by infection of *Agrobacterium tumefaciens* isolated in soil. Arrow indicate survival of *Agrobacterium tumefaciens* on the medium with 250 μ g/ml of carbenicillin.

형성된 callus를 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않고 carbenicillin이 250 μ g/ml 첨가된 MS배지에 3번째 옮겨 *Agrobacterium* strain이 전혀 나타나지 않을때 항상체 무첨가 배지에 계대배양하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 보는 바와 같이 callus의 생장이 매우 완성하였으며 callus의 색깔은 미색을 띄었고 일부 단단한 구형의 형태를 나타낸 것도 있었지만 매우 불규칙적인 형태를 나타내었다. 또한 callus의 밑부분이 터져 녹색을 띄우면서 성장된 callus도 있었으며 간혹 shoot가

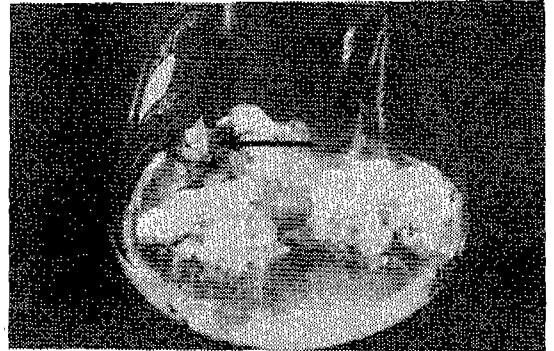


Fig. 4. Callus growth and shoot formation(←) of tobacco transformant on the phytohormone free medium.

녹색부위에서 형성된것을 관찰할 수 있었다. 그러나 형성된 shoot를 채취하여 다시 식물호르몬 무첨가 배지에 계대배양하면 정상 식물체로 성장하지 못하고 모두 teratome shoot로 성장하였다.

형성된 teratoma shoot의 형태는 *Agrobacterium tumefaciens* stain에 따라 다소 차이가 있었는데 C23-

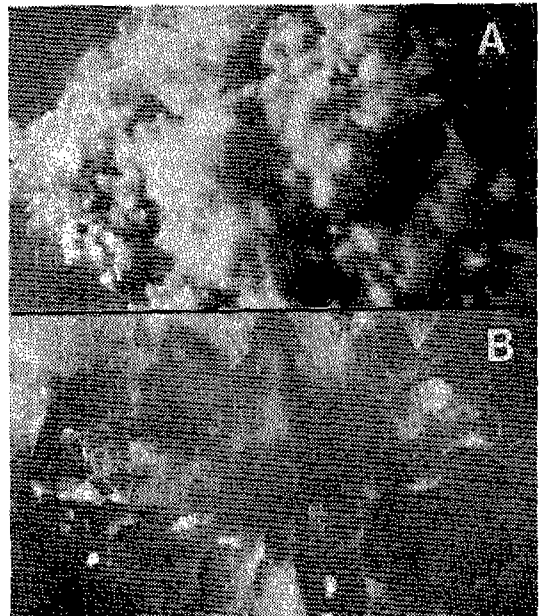


Fig. 5. Teratoma shoots derived from calli transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C23-1(A) and K29-1(B)

1의 경우에는 매우 작은 기형의 shoot가 많이 형성되었고(Fig. 5-A), K29-1도 정상적으로 성장하지 못했지만 C23-1에 비해 다소 더 커다란 shoot들이 형성되었다(Fig. 5-B). *Agrobacterium tumefaciens* C23-1과 K29-1에 의하여 형질전환된 조직은 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배지에서 왕성히 성장하는데, 이는 Ti-plasmid의 일부인 T-DNA에 coding되어있는 식물호르몬 자가합성유전자가 발현되어^{11, 13, 14)} 탈분화가 일어난것으로 판단된다. 그러나 계속적인 계대배양동안 shoot가 형성되지만 정상적인 shoot로 성장하지 못하고 teratoma shoot만이 형성된 것은 선발한 균주와 식물체간의 상호작용에 의해서 일어나는 현상¹⁾으로 생각된다.

이미 Choi등⁴⁾은 Schroth선택배지에서 *Agrobacterium* spp.를 선발하여 연초 *Nicotiana tabacum* BY4 조직을 형질전환시켰지만 형질전환된 조직은 정상식물체와 마찬가지로 식물호르몬에 반응하였으며 재분화되어 정상적인 식물체와 같이 성장함을 보고하여⁶⁾ 본실험에서 선발한 균주와 매우 차이가 있음을 나타냈었다. 그러나 nopaline type인 *Agrobacterium tumefaciens* C58을 연초에 감염시켜 형질전환된 조직은 본실험에서 나타난 바와 같이 teratoma shoot만이 형성되어⁵⁾ 사용한 식물체와 사용균주간에 shoot의 형태가 매우 달라짐을 알수있었다. 따라서 본실험에서 선발된 *Agrobacterium tumefaciens* C23-1과 K29-1를 타식물체에 계속적으로 접종하여 동일한 형태의 shoot만이 형성되는지 여부를 조사하여 본균주에 대한 shoot형성의 특성을 밝혀야 할것으로 사료된다.

요 약

고등식물의 형질전환용 유전자 운반체로써 가장 많이 사용되고 있는 Ti-plasmid를 이용하여 연초세포를 형질전환시키기 위한 연구의 일환으로, 국내토양중에서 *Agrobacterium* spp.를 분리, 동정하여 *Nicotiana glauca*의 줄기를 이용해서 동시배양법에 의해 형질전환을 유도하였다. *Agrobacterium* spp.를 분리, 동정하기 위해서 자연상태에서 형성된 tumor조직과

근권토양를 채취하여 선택배지를 이용하여 총 99균주를 분리하였으며, 그중에서 34균주가 당근 disc위에서 tumor를 형성하였다. 분리균주중에서 C23-1과 K29-1은 tumor의 형성기기와 형성능력이 매우 뛰어나았으며, 각각 *A. tumefaciens* biotype 1과 *A. tumefaciens* biotype 2로 동정되었다. 동정된 *A. tumefaciens* 2종과 연초줄기절편을 동시배양방법에 의해서 형질전환을 유도한 후 식물호르몬이 전혀 첨가지 않은 MS기본 배지에서 생장이 형질전환체를 선발하였다. 형질전환된 연초 Callus는 식물호르몬 무첨가 배지에서 왕성하였으며 또한 shoot도 형성하였다. 그러나 형성된 shoot는 모두 teratoma shoot로 성장하였으며 shoot의 형태는 C23-1균주에 형질전환된 조직이 K29-1보다 shoot의 크기가 적어 균주에 따라 차이가 있음을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Amasino, R. M. and C. O. Miller, Plant Physiology 69 : 389-392(1982).
2. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1 Williams & Wilkins, Baltimore pp244-254 (1984).
3. Cha, Y. C., Korea Univ. M.S. Thesis(1982)
4. Choi, K. T., D. C. Yang, H. S. Baik, S. W. Park and C. H. Lee, Korea J. Breed 17(4) : 348-356(1985).
5. Choi, K. T., D. C. Yang, and D. C. Yang, Korea J. Breed 18(2) : 52-57(1986).
6. Choi, K. T. and D. C. Yang, Korea J. Breed 17(4) : 196-202(1987).
7. Clark, A. G., J. of Appl. Bacteriol. 32 : 348-351(1969)
8. Drummond, M. H., M. P. Gordon, E. W. Nester and M. D. Chilton, Nature (London) 269 : 535-536(1977).
9. Kado, C. I. and M. G. Heskeff, Phytopathology 60 : 969-976(1970)

10. New, P.B. and A. Kerr, *J. Appl. Bacteriol.* 34 : 233-236(1971)
11. Otten, L.A.M.B. and R.A. Schilperoort, *Biochim. Biophys. Acta* 572 : 497-500(1978).
12. Schroth, M.N., J.P. Thompson and D.C. Hildebrand, *Phytopathology* 55 : 645-647 (1965).
13. Shaw, C.M., M.D. Watson, G.H. Carter and G.H. Saw, *Nuc. Acid. Res.* 12 : 6031-6041(1984).
14. Shroder, G., S. W. Schmidt, E.W. Weiler and J. Schroder, *Eur. J. Biochem.* 138 : 387-391(1984).
15. Stachel, S., B. Timmerman and P. Zambryski, *Nature* 322 : 706-712(1986).