

한국산 고감염 *Agrobacterium* spp의 분리 및 연초의 형질전환에 이용

양덕춘* · 정재훈¹ · 이정명²

한국인삼연초연구원 유전생리부, ¹공주경희대학교 원예학과, ²경희대학교 원예학과

Isolation of Hypervirulent *Agrobacterium* spp from Korea and Application for Transformation of Tobacco

YANG, Deok Chun* · JUNG, Jae Hoon¹ · LEE, Jung Myung²

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taejon, 305-345, Korea: ¹Horticulture, Kongju National University, Yeasan 340-800, Korea : and ²Department of Horticulture, Kyung Hee University, Yongin, Kyungi-do, 449-900, Korea. *Corresponding author.

Total of 78 strains were characterized based on the morphological characteristics of colonies isolated on Schroth, and New & Kerr's media for selection of hypervirulent wild-type *Agrobacterium* spp from galls, hairy root-like process and soil of *Populus*, *Malus*, *Salix* and *Diopyros* in Korea. Among them, 48 strains were able to induce tumors in carrot disc. Hypervirulent *A. tumefaciens* SP101 and SM042 were identified as biotype 1 and biotype 2, respectively. These strains formed fast growing, larger tumors as compared to those induced by other strains. The binary vector pGA643 with kanamycin resistant gene was mobilized from *E. coli* MC100 into *A. tumefaciens* strain SM042 isolated from soil, and/or disarmed vector PC2760 using a triparental mating method with *E. coli* HB101/pRK2013, and transconjugants, *A. tumefaciens* SM643 and PC643 were obtained in minimal media containing kanamycin and tetracycline. Tobacco tissues were cocultivated with conjugant *Agrobacterium* and then transferred to selective medium with 2,4-D and kanamycin to induce the transformants. Calli were formed more efficiently in cocultivation with *A. tumefaciens* SM643 than that with *A. tumefaciens* PC643. Most of calli transformed with *A. tumefaciens* PC643 were friable and regenerated into normal plantlets, while the calli transformed with *A. tumefaciens* SM643 were compact, hard, and mixed with friable calli. The friable calli formed normal shoots, while compact calli did not form shoots but only grew to typical compact tumor calli. When the shoots formed directly from tobacco stems without callus induction after transformation by *A. tumefaciens* SM643 with wild-type Ti-plasmid, normal transformed plants can be induced without using disarmed Ti-plasmid.

Key words: disarmed Ti-plasmid, NPT II gene, Rol C gene, regeneration, wild-type Ti-plasmid

Agrobacterium spp는 두과작물에서 뿌리혹을 형성하는 *Rhizobium* spp와 함께 근류세균과에 속하는 토양세균으로써, crown gall tumor를 형성하는 *Agrobacterium tumefaciens*를 포함하여 hairy root를 형성하는 *Agrobacterium rhizogenes*와 cane gall tumor를 형성하는 *Agrobacterium rubi*, 그리고 무병주인 *Agrobacterium radiobacter* 등 주로 4종으로 크게 구분되며, 생리적 특성에 따라 다시 *A. tumefaciens*는 biotype 1, 2, 3, *A. radiobacter*는 biotype 1, 2, *A. rhizogenes*는 biotype 2, 그리고 *A. rubi*로 모두 7 개의 biotype으로 구분되어 있으며, 같은 biotype에서도 plasmid의 특성에 따라 많은

strain들이 구분되어 있다(Clark, 1969; Kado, 1970; New and Kerr, 1971; Schroth et al., 1965). *A. tumefaciens*는 1907년에 Smith와 Townsend에 의해서 근두암종병(crown gall tumor)을 유발하는 병원세균으로 명명된 이래 gram-positive bacilli, cocci, 그리고 fungi의 생장이 억제되는 glucose-crystal violet-taurocholate agar 배지에서 *Agrobacterium*을 분리하였고(Patel, 1926), 당근 disc를 이용하여 *Agrobacterium*을 분리하는 방법이 보고되었다(Ark and Schroth, 1958). 또한 lactose와 MnSO₄가 함유된 배지를 이용하여 다른 토양미생물의 생장을 억제하고 *Agrobacterium*만이 성장할 수 있는 선발배

지로 분리하는 방법(Clark, 1969), bromothymol blue를 배지에 첨가하여 *Agrobacterium*이 탄소원인 mannitol을 이용해서 색깔변화를 기준으로 하여 분리할 수 있는 방법이 제시되었다(Kado and Heskeff, 1970). 특히 Schroth et al.,(1965)에 의해서 다량의 항생제가 첨가된 배지에서 *A. tumefaciens*와 *A. radiobacter* group을 분리하는 방법이 개발되었고, New와 Kerr(1971)에 의해서 *Agrobacterium* spp의 biotype 2을 선별할 수 있는 방법이 제시되어 오늘날 가장 널리 이용되고 있다. 식물세포의 형질전환은 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid의 기작이 밝혀지고(Chilton et al, 1982; Stachel and Zambryski, 1986), Ti-plasmid의 T-region과 virulence region이 따로 존재하여도 정상적인 형질전환이 가능하다는 보고에 의해서(Hamil et al., 1986; Stachel and Zambryski, 1986) 많은 binary vector system이 개발되었으며, 이에 따라 유전자의 조작이 매우 간편해졌고 binary vector를 *Agrobacterium*에 도입하여 사용함으로써 식물세포의 형질전환도 훨씬 쉽게 되었다(An G, 1987; Hoekerna et al., 1983; Simpson, 1986). 그러나 식물체에 따라서는 *Agrobacterium*에 의해서 나타내는 반응정도가 서로 다르며, 또한 *Agrobacterium* 종류에 따라서 식물체가 나타내는 반응정도도 달라 형질전환율에 많은 차이를 보였다(De Cleene et al., 1983). 따라서 기주범위가 매우 넓고 형질전환율이 높은 새로운 *Agrobacterium*의 분리가 요구되며, 이미 pTiBO542와 같은 매우 hyper-virulent 한 Ti-plasmid를 함유한 균주를 선별한 바 있다(Hood et al., 1986; Jin et al., 1987). 본 실험은 다량의 항생제가 포함되어 있는 Schroth, New and Kerr배지를 이용하여 국내 토양에서 자생하는 *Agrobacterium*을 분리 및 동정하고, 특히 고감염 *Agrobacterium*을 선별하여, kanamycin 유전자가 재조합되어 있는 binary vector를 도입하고 wild-type Ti-plasmid를 이용하여 연초조직을 형질전환시켜 정상적인 연초식물체를 획득하고자 수행하였다.

재료 및 방법

자연산 tumor조직 및 근권토양의 채취

자연발생 tumor 조직 및 근권토양으로부터 *Agrobacterium*을 분리 및 동정하기 위해서 대전, 청주, 예산지역에 자연적으로 분포되어 있는 *Salix*, *Diospyros*, *Populus*, *Malus*에 형성된 crown gall tumor, cane gall tumor, hairy root를 탐색하여 tumor 조직과 근권토양을 멸균된 용기에 채취하였으며, 특히 근권토양은 지표 10 cm 아래의 토양을 채취하였다.

Agrobacterium spp의 분리

채취한 tumor조직과 근권토양을 멸균증류수에서 10%의

현탁액을 만든 다음 1일동안 shaker에서 진탕배양시킨 후 0.1 mL용액을 Schroth(1965), New and Kerr(1971)선택배지에 도말하여, 29°C에서 2-7일간 암상태로 배양하면서 colony 형성여부를 관찰하였다. 형성된 colony는 형태적 특성에 따라 분리한 후 계속 3회 더 동일배지에 streaking하여 단일 colony를 분리하였다. 분리된 균주는 YEB(beef extract 5.0 g/L, peptone 5.0 g/L, yeast extract 1.0 g/L, sucrose 5.0 g/L, MgSO₄ 0.406 g/L, pH 7.1)배지에서 증식시켜 원심분리하여 상등액을 제거하고 50%의 glycerol를 1 mL 첨가하여 균일하게 현탁시킨 후 -20°C의 냉동실에 보관하면서 균동정에 사용하였다.

분리 균주에 의한 당근조직의 tumor 형성능 확인

선택배지에서 분리한 균주를 YEB배지에서 1일간 배양한 후 균밀도가 대략 10⁷/mL개 되었을 때(spectrophotometer의 600 nm에서 O.D가 0.8) 수확하여 접종에 사용하였다. *Agrobacterium*의 tumor 형성능을 조사하기 위해서 식물호르몬 무첨가 water agar plate (1.5%)에 carbenicillin 250 µg/mL를 첨가하여 멸균된 당근절편을 0.5 cm 높이로 절단한 후 치상하였다. 당근의 소독은 깨끗한 물로 세척하고 70%의 ethanol에서 3분간 침지한 후 2%의 NaOCl에서 20분간 소독하여 멸균증류수로 3회 세척하였다. 치상된 당근 disc위에 1일간 YEB배지에서 배양된 균주의 현탁액 0.1 mL를 도말하여 25°C의 배양실에서 배양하면서 tumor의 형성여부를 관찰하였다.

Agrobacterium spp의 동정

당근조직에서 tumor의 형성이 매우 빠른 SD021, SP021, SP101, SM021, SM042, NP061, NP023 균주를 우선 동정하기 위해서 생장온도 및 NaCl 내성조사는 Graham과 Parker(1964)의 방법에 따라, 3-ketolactose 생산조사는 Bernaerts와 Dealy(1963)방법, Meso-erythritol과 melezitose첨가배지로부터 산 생성조사는 bromothymol blue가 포함된 Hayward(1964)의 배지를 이용하여 동정하였다. 또한 Simmon's citrate agar로부터 알카리의 생성조사는 NaCl 5.0 g, MgSO₄ 7H₂O 0.2 g, ammonium dihydrogen phosphate 1.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Na-citrate 5.0 g, bromothymol blue(1% soln) 8 mL, agar 15 g을 증류수 1 liter에 pH를 7.0으로 조정하여 배양한 배지에서 녹색이 청색으로 변화되는 것을 관찰하여 알카리 생성으로 간주하였으며(Simmons, 1926), tartarate 첨가에 의한 알카리 생성조사는 (NH₄)₂SO₂ 2 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄ 0.6 g, KH₂PO₄ 0.4 g, bromothymol blue 0.025 g, yeast extract 0.1 g을 증류수 1 liter에 용해시킨 후 4.5 mL를 채취하여 1% tartaric acid 용액 0.5 mL를 첨가하여 7일간 배양하면서 알카리 생성여부를 조사하였다

(Simmons, 1926). 동정의 최종 판결은 Bergey's manual (1984)에 준하여 수행하였다.

Agrobacterium spp의 항생제 내성 조사 및 binary vector의 도입

동정된 *Agrobacterium*의 항생제 내성을 조사하기 위해서 kanamycin과 G418의 농도를 각각 0, 10, 30, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 그리고 tetracycline 0, 5, 10, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 멸균된 YEB배지의 온도가 약 55°C 정도 되었을 때 추가로 첨가하여 SD021, SP021, SP101, SM021, SM042, NP061, NP023 균주를 도말한 후 생장여부를 조사하였다. 또한 선발배지에서 분리한 한국산 *A. tumefaciens* SM042와 disarmed Ti-plasmid를 함유하고 있는 *A. tumefaciens* PC2760에 kanamycin 저항성 유전자(NPT II gene)를 함유하고 있는 pGA643 binary vector를 도입하여 conjugant를 얻기 위해서는 tri-parental mating 방법(Ditta, 1980)을 약간 수정하여 수행하였으며, conjugant의 선발은 AB배지에 tetracycline 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 kanamycin 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 첨가된 배지에서 선발하였다. 배지로서는 AB, MGL 및 LB배지를 사용하였으며 각종 항생제 배지에서 수용체인 *Agrobacterium* spp와 공여체인 *E. coli* MC1000/ pGA643, 그리고 helper인 *E. coli* HB101/pRK2013의 생존여부를 조사하였다(An et al., 1986).

Agrobacterium에 의한 연초의 형질전환과 재분화

Kanamycin 저항성 유전자가 도입되어 있는 *A. tumefaciens* SM643과 disarmed Ti-plasmid를 함유하고 있는 *A. tumefaciens* PC643를 이용해서 연초를 형질전환시키기 위해서 *Nicotiana glauca*의 줄기와 균주를 동시배양 한 후에 우선 carbenicillin 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 kanamycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 그리고 2,4-D 0.5 mg/L 첨가된 배지에 접종하여 캘러스의 형성 여부와 형태적 특성을 조사하였다. 또한 캘러스를 유도하지 않고 직접 shoot를 형성시키기 위해서는 carbenicillin 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 kanamycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 그리고 NAA 0.5 mg/L, BA 2.5 mg/L 첨가된 선택배지에 접종하여 형질전환체를 선발하였다.

PCR에 의한 Rol C 및 NPT II 유전자의 확인

A. tumefaciens SM643 및 PC643에 의하여 유도된 반구형의 단단한 캘러스와 friable한 캘러스에서 Rol C 유전자와 NPT II 유전자를 확인하기 위하여 PCR(Thermal cycler, Perkin Elmer Cetus)를 사용하였다. 우선 캘러스로부터 DNA를 추출하였으며(Edwards et al, 1991), Taq polymerase, dNTP, MgCl₂, buffer, dye등이 혼합되어 있는 Premix(Bioneer, Korea)에 추출한 DNA 50 ng, primer 20

pmol을 첨가하여 총량을 20 L로 하였다. PCR 반응조건은 우선 96°C에서 2분간 pre-denaturation한 후, 96°C에서 30 초간 denaturation, 55°C에서 30 초간 annealing, 72°C에서 2분간 extension 하여, 증폭을 36 회 반복시킨 후 72°C에서 15분간 post-extension 시키는 조건으로 하였다. PCR 반응시 사용한 primer는 Rol C 유전자의 증폭을 위하여(Oono et al, 1993), 5'-ATGGCTGAAGACGACCTGTGTT-3', 5'-TTAGCCGATTGCAAACCTTGCAC-3'를 사용하였고, NPT II 유전자의 증폭을 위하여 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3', 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGT-3'를 사용하여 각각 500 bp 및 700bp의 DNA 절편을 합성하였다. 합성된 DNA밴드는 1.2% agarose gel에서 1 Kb ladder와 함께 전기영동하여 크기를 확인하였다.

결과 및 고찰

한국산 tumor 조직 및 근권토양의 채취 및 특성

대전, 예산, 청주지역의 과수원과 야산에서 tumor조직을 탐색한 결과 *Salix*, *Diospyros*, *Populus* 및 *Malus*에서 쉽게 관찰할 수 있었으며 tumor의 발생부위와 형태에 많은 차이가 있었다(Figure 1). Tumor의 발생은 *Populus*(Figure 1- P1 - P10)에서 가장 많이 발견되었으며 tumor가 형성된 식물체의 지상부 생장은 다른 미감염 식물체에 비해 생장이 불량하게 나타나지는 않았다. 또한 *Malus*(Figure 1-M1, M2, M3), *Salix*(Figure 1-S1, S3), *Diospyros*(Figure 1-D1) 에서도 tumor가 발생되었으며 대부분 지표 바로 밑부분에서 발생하는 crown gall tumor가 많았다. 그러나 지상부의 줄기에서도 tumor가 형성되었으며 특히 *Malus*에서는 hairy root와 같은 돌기가 형성된 tumor도 관찰되었다(Figure 1-M1, M2). 또한 *Salix* 중에서도 S1의 경우에는 줄기에 gall이 형성되었으나 뿌리부분에는 S2와 같이 전혀 gall이 형성되지 않았다(Figure 2-S1, S2). 그러나 S3의 경우에는 줄기에도 gall이 형성되었으며 뿌리에도 crown gall이 형성되어 있었다(Figure 2-S3). *Populus*중에서도 P1과 같이 crown gall은 형성되었으나 stem gall은 전혀 형성되지 않은 반면 P2, P5의 경우에는 stem gall과 crown gall이 모두 형성되었다. 그러나 P4와 P7은 stem gall은 형성되었으나 crown gall은 형성되지 않았다. *Malus* 중에서는 M1과 M2처럼 hairy root와 같은 돌기가 형성되었으며 특히 M1은 여러군데 돌기가 형성된 반면 M2에서는 한군데에서만 돌기가 형성되었다. 또한 M3는 gall과 같은 돌기가 형성되어 있었다(Figure 1). 자연상태에서 발생하는 crown gall은 *A. tumefaciens*에 의해서, 그리고 cane gall은 *A. rubi*에 의해서 주로 형성된다고 보고되어 있어(Braun and Wood, 1976; Keane et al, 1970), 본 실험에서 채취한 gall의 형성도 이런 균주에 의해서 형성된 것으로 생각되지

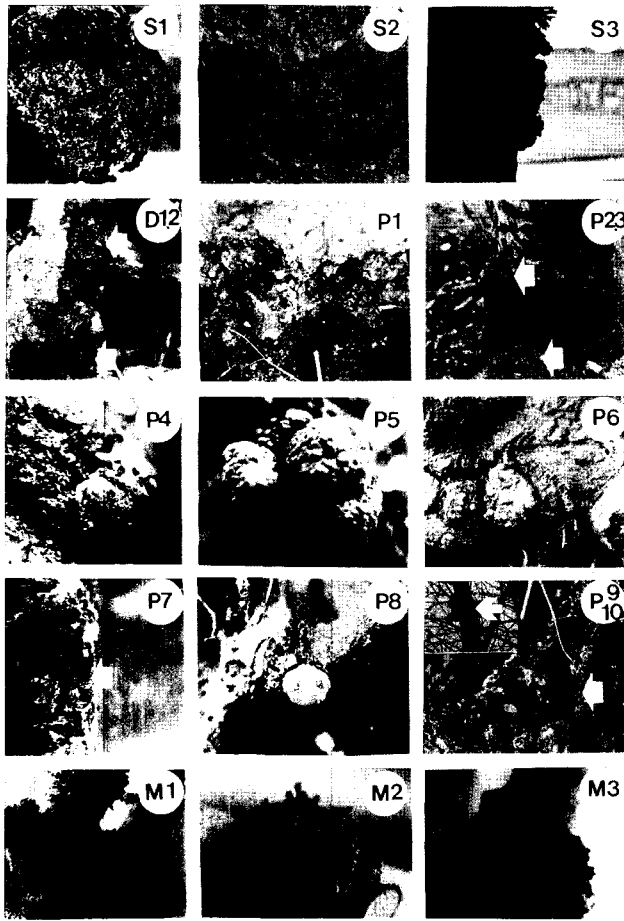


Figure 1. Tumors and root-like process induced from the infection of *Salix*(S), *Diospyros*(S), *Populus*(S) and *Malus*(S) by wild-type *Agrobacterium* in Korea.

만 과연 이런 gall과 모양으로부터 *Agrobacterium* 선발배지인 Schroth, New and Kerr배지에 의해서 균을 분리할 수 있는지 조사를 해야 할 것이다. 본 연구에서는 국내에서 자생하고 있는 *Agrobacterium*을 선발하여 식물형질전환용 운반체로 사용하고자 국내 일부지역에서 *Agrobacterium*에 의하여 형성된 tumor조직을 탐색하였기 때문에 형성된 tumor조직과 근권토양을 같이 채취하였으며, 특히 근권토양은 S2, D2, P10, 그리고 M1, M2의 토양을 수집하여 *Agrobacterium* 선발배지에 의해서 균을 분리 동정하고자 하였다.

Agrobacterium spp의 분리

Agrobacterium 선택배지로써 Schroth 및 New and Kerr배지에 각지역 및 기주식물의 종류별로 채취한 tumor조직과 근권토양을 10% 현탁하여 0.1 mL의 현탁액을 접종한 결과 배양 3 일후에는 대부분 colony형성을 관찰할 수 있었으나 토양에서 발견되어지는 일반 다른 세균의 오염은 거의 없었으며 흔히 나타나는 곰팡이도 거의 나타나지 않아, 이 배지들은 *Agrobacterium*을 분리하는데 매우 효과적임을 알 수 있었다. 형성된 colony의 형태적 특징을 조사한 결과 Schroth선택배지에서는 colony의 형태가 대부분 둥근모양을 하고 있었으며, colony의 표면은 거의가 glistening 상태이었고, 간혹 watery glistening상태를 보이기도 하였다(Table 1). 또한 투명도는 거의 translucent상태이었지만 opaque상태도 간혹 관찰되었다. Colony들의 가장 현저한 차이는 색깔과 크기였는데 색깔은 주로 하얀색과 노란색이 대부분이었으며 크기는 0.2-4 mm까지 매우 다양하였다(Table 1). New and Kerr배지에서도 Schroth 선택배지와 거의 비슷하였으나 색깔이 NS034와 NP052를 제외하고는 모두 하얀색으로 나

Table 1. Morphological characteristics of colonies isolated on the Schroth's selective medium.

Strains	Color	Size (mm)	Surface	Clearness	Strains	Color	Size (mm)	Surface	Clearness
SS011	White	2	Glistening	Translucent	SP061	White	0.2	Glistening	Translucent
SS021	"	0.5	"	"	SP062	"	3	"	"
SS022	Yellow	0.5	"	"	SP071	"	0.5	"	"
SS031	White	0.2	"	"	SP072	"	0.2	"	"
SD011	"	0.5	"	"	SP081	"	3	"	"
SD012	"	0.2	"	"	SP082	"	0.5	"	"
SD021	"	4	Watery-glistening	"	SP091	"	0.5	"	"
SD022	"	0.5	"	"	SP092	"	0.2	"	"
SD023	"	0.2	Glistening	"	SP101	Yellow	0.5	"	"
SP011	"	0.2	"	"	SM011	White	0.2	"	"
SP012	Yellow	0.2	"	Opaque	SM021	"	3	Watery-glistening	"
SP021	White	0.5	"	Translucent	SM022	"	0.5	Glistening	"
SP022	"	0.5	"	"	SM023	"	0.2	"	"
SP031	"	0.2	Watery-glistening	"	SM031	Yellow	0.5	"	"
SP041	"	2	Glistening	"	SM032	White	0.2	"	"
SP042	"	0.2	"	"	SM033	Yellow	0.2	"	"
SP051	"	0.2	"	"	SM041	White	3	"	"
SP052	"	2	"	"	SM042	"	0.2	"	"
SP061	"	0.2	"	"	SM051	"	2	"	"

Table 2. Morphological characteristics of colonies isolated on New and Kerr's selective medium

Strains	Color	Size (mm)	Surface	Clearness	Strains	Color	Size (mm)	Surface	Clearness
NS011	White	2	Glistening	Translucent	NP051	White	0.2	Water-glisten	Translucent
NS012	"	0.5	"	"	NP052	Yellow	0.5	"	"
NS013	"	0.2	"	"	NP061	White	0.5	"	"
NS021	"	2	"	"	NP071	"	2	"	"
NS022	"	0.5	"	"	NP081	"	2	"	"
NS023	"	0.5	"	Opaque	NP091	"	0.2	"	"
NS024	"	0.2	Watery-glistening	"	NP101	"	3	"	Opaque
NS031	"	3	"	Translucent	NP102	"	0.5	"	Translucent
NS033	"	0.5	"	Opaque	NP103	"	0.2	"	"
NS034	Yellow	0.2	"	Translucent	NM011	"	0.2	Glistening	"
ND011	White	2	"	"	NM021	"	3	"	"
ND012	"	0.2	"	"	NM022	"	0.5	"	"
ND013	"	0.5	"	"	NM023	"	0.2	"	"
ND021	"	3	"	"	NM031	"	0.5	"	"
ND022	"	0.5	"	"	NM041	"	2	"	"
ND023	"	0.2	"	"	NM042	"	0.5	"	"
NP011	"	0.5	"	"	NM043	"	0.2	"	"
NP021	"	2	"	"	NM051	"	2	"	"
NP031	"	0.5	"	"	NM052	"	0.5	"	"
NP041	"	0.2	"	"	NM053	"	0.2	"	"

타났으며, colony의 크기도 0.2-3 mm의 분포를 보였으나 0.2mm의 크기의 경우 Schroth의 배지에서는 45%로 New and Kerr배지 33%보다 더 많이 나왔다(Table 2). Schroth(1965)는 본 실험과 유사하게 배양 4일후에는 2-4 mm크기의 colony가 형성되었다고 하였으며 형태도 glistening, circular, translucent상태로 나타났으며 색깔은 노란색에서 연한 노란색상태로 나타난다고 보고하였다. 또한 New 와 Kerr(1971)도 선택배지에서 5-6 일후에는 colony를 분리할 수 있었고, 다른 형태적 특성도 Schroth 선택배지에서 나타나는 상태와 비슷하게 보고하였으나 색깔이 주로 연한 회색으로 나타난다고 보고하여 본 실험에서는 주로 하얀색의 colony가 나타난 것과 다르게 보고하였다. 본 실험에서는 이런 colony의 특성을 이용하여 Schroth선택배지에서 총 38 균주를 분리하였으며(Table 1), New and Kerr배지에서는 40 균주를 분리하여(Table 2) 균동정에 사용하였다.

당근 disc를 이용한 선발균주로부터 tumor의 유기

선택배지에서 분리한 균주를 당근 disc전면에 골고루 도말하여 배양한 결과 7 일 경부터는 균주에 따라서는 tumor의 형성반응이 나타났으며 10일 후부터는 육안으로 관찰할 수 있을 정도의 크기로 성장하였고 배양 30일후에는 tumor 조직을 절취하여 식물호르몬 무첨가배지에 계대할 수 있을 정도의 크기가 되었다(Figure 2). 그러나 균주에 따라 형성된 tumor의 크기에 차이가 있었는데 disc 전면에 tumor가 형성되는 경우(Figure 2-A), 형성충부위에서만 tumor가 형성되는 경우(Figure 2-B), 특정부위에서 tumor가 형성되어 점차 확산되는 경우(Figure 2-C), 특정부위에서만 tumor가

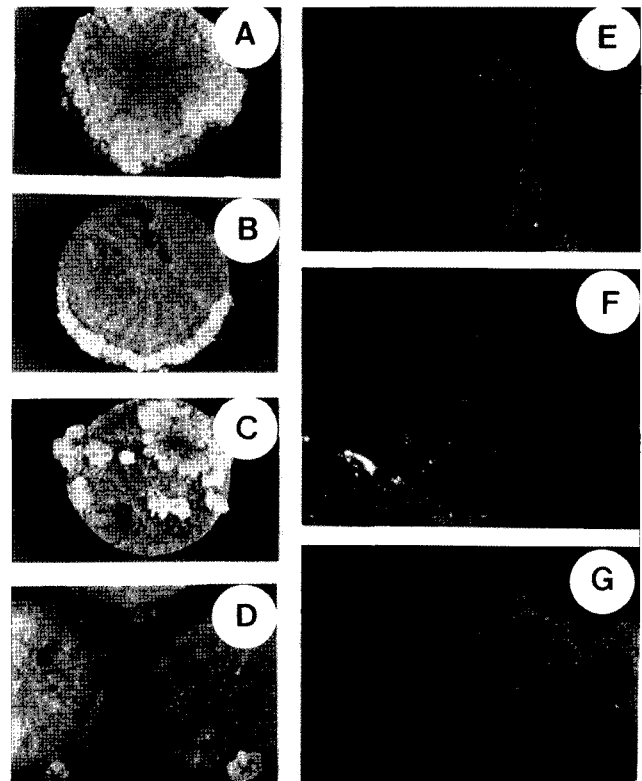


Figure 6. Various types of carrot tumors induced by wild-type *Agrobacterium* spp isolated in Korea. A-D: typical tumor types, A: spread tumors on disk surface, B: tumors formed on cambium, C: spread tumors from specific site on disk: D: tumor formed in specific site, E-F: tumors induced by hyper-virulent *Agrobacterium*, E: SM042, F: SP101, G: NP101.

형성되어 성장하는 경우(Figure 2-D)가 있었다. Schroth선택

Table 3. Tumor formation on carrot discs infected by strains isolated on selective media after 30-days culture.

Selection on Schroth' media			Selection on New and Kerr's media		
Strains	Tumor formation	Virulence	Strains	Tumor formation	Virulence
SS011	+	Low	NS013	++	Medium
SS022	++	Medium	NS021	+	Low
SS031	++	Medium	NS023	++	Medium
SD011	++	Medium	ND011	++	Medium
SD021	+++	High	NP011	++	Medium
SD022	++	Medium	NP031	+	Low
SD023	++	Medium	NP061	+++	High
SP011	++	Medium	NP081	++	Medium
SP021	+++	High	NP101	++++	Hyper
SP031	++	Medium	NP102	++	Medium
SP041	+	Low	NM021	++	Medium
SP062	+	Low	NM022	++	Medium
SP101	++++	Hyper	NM023	+++	High
SM021	+++	High	NM041	++	Medium
SM042	++++	Hyper	NM042	++	Medium

배지에서 선발한 38균주중에서 tumor를 형성한 균주는 총 16 종이었으며, 이 중에서 tumor의 크기가 매우 크며(직경 4 mM 이상) 형성시기도 빨라 hypervirulent 균주로 생각되는 것은 *Populus*에서 crown gall을 형성한 근권토양으로부터 분리한 균주인 SP101(Figure 2-F)과, hairy root와 같이 돌기를 형성한 *Malus*의 근권토양에서 분리한 SM042(Figure 2-E) 2개의 균주였다(Table 3). 또한 3종의 균주에서도 매우 커다란 tumor가 형성되었으며(3-4 mM), 7종의 균주에서 중간크기(1-2 mM), 그리고 3종은 적었으며(2-3 mM), 1종은 매우 적은(1 mM이하) 상태의 tumor를 형성하였다(Table 3). New and Kerr배지에서 선발한 40 균주중에서는 tumor를 형성한 균주가 32종이었으며, 그 중에서 자연상태에서 crown gall을 형성한 *Populus*의 근권토양에서 분리한 NP101(Figure 2-G)균주가 hypervirulent균주로 나타났으며, high균주로 나타난 것은 NP061, NM023 2종이었다(Table 3). 한편 자연발생 tumor조직과 근권토양중에서 선발배지를 이용하여 분리한 균주중에서 tumor를 형성하지 않았던 것은 대전지역에서 채취한 *Malus*나무중 stem gall(P3)에서 분리한 균주와, 예산지역에서 채취한 *Malus*의 hairy root(M1, M2)와 같은 돌기에서 분리한 균주, 그리고 *Malus*의 gall과 같은 조직(M3)에서 분리한 균주에서는 전혀 tumor나 hairy root가 형성되지 않았다. 이런 원인이 hairy root로 생각해서 채취했던 M1, M2조직의 돌기나 gall과 같은 M3조직이 *Agrobacterium*감염에 의해서 생긴조직이 아닌 다른 돌기일 가능성이 높다. Bergey's manual에 의하면 당근 disc를 tumor형성 지표식물로 이용할 경우 *A. tumefaciens* biotype 1, 2 와 *A. rubi*에서는 tumor가 형성되고, *A. rhizogenes* biotype 2에서는 대부분 hairy root가 형성되지만, *A. tumefaciens* biotype 3에서는 tumor의 형성이 매우 어려우며, *A. radiobacter*에서 전혀 tumor가 형성되지 않은 무병주인것으로 보고되어 있다. 따라서 본 선발배지에서 선발한 균주

에서는 Schroth에서 42%, New and Kerr배지에서 80%만이 tumor가 형성되었는 바, 나머지 균주는 *A. tumefaciens* biotype 3 이거나 무병주인 *A. radiobacter*일 가능성도 있지만 *Agrobacterium*이 아닌 전혀 다른 균주일 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 대체로 *Agrobacterium*의 선발배지로서 Schroth, New and Kerr배지가 무난한 것으로 생각된다.

Agrobacterium spp의 동정 및 선발

선발배지에서 분리되고 당근 disc위에서 tumor를 형성하는 균주중에서 tumor의 형성이 빠르고 생장량이 많은 8 균주를 선발하여 동정하였다. 우선 당근 disc위에서 모든 균주가 tumor만 형성하였지 hairy root는 형성하지 않았으므로 *A. rhizogenes*일 가능성은 약하며, 또한 무병주인 *A. radiobacter*일 가능성은 전혀 없다. 따라서 상기 8 균주는 대부분 *A. tumefaciens*이거나 *A. rubi*일 가능성이 높다. Bergey's manual에 의해서 동정에 들어간 결과(Table 4), SP101과 NP101은 생리적인 특성이 *A. tumefaciens* biotype 1과 같았으며, SM042와 NM023은 *A. tumefaciens* biotype 2와 같았다. 그러나 다른 균주는 생리적인 특성이 명확하게 biotype을 결정할 수 있도록 구분되지는 않았다(Table 4). 또한 biotype 1으로 동정된 SP101과 NP101은 선발배지만 다를 뿐 동일 tumor조직에서 분리하였기 때문에 같은 균주일 것으로 사료된다. 따라서 본 실험에서는 SP101을 *A. tumefaciens* SP101 biotype 1으로 동정하였고, SM042는 *A. tumefaciens* SM042 biotype 2로, 그리고 NM023은 *A. tumefaciens* NM023 biotype 2 로 동정 및 명명하였다.

선발 *Agrobacterium* spp의 항생제 내성

*Agrobacterium*에 binary vector인 pGA643을 도입하기 위해

Table 4. Physiological characteristics of high and super-virulent *Agrobacterium* strains isolated on selective media.

Characteristics	SD021	SP021	SP101	SM021	SM042	NP061	NM023	NP101
Growth at 35°C	+	+	+	-	-	+	-	+
28°C	+	+	+	+	+	+	+	+
2% NaCl	+	+	+	+d	+d	-	+d	+
Production of 3-ketolactose	-	-	+	-	-	-	-	+
Acid from meso-erythritol	-	+	-	-	+	-	+	-
Acid from melezitose	+	+	+	-	-	-	-	+
Alkali from tartarate	+	d	d	d	d	d	+	d
Simmon's citrate(0.0005%)	+	+	-	-	+	-	+	-

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

Table 5. The effects of kanamycin, G418 and tetracycline on the growth of *Agrobacterium* strains isolated on selective media

Antibiotics Conc.		Selective <i>Agrobacterium</i> strains						
		SD021	SP021	SP101	SM021	SM042	NP061	NM023
Kanamycin (g/mL)	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	10	++++	++++	++++	++++	+++	+++	-
	30	++	++	+++	+++	-	-	-
	50	-	-	++	+++	-	-	-
	100	-	-	+	+++	-	-	-
G418 (g/mL)	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	10	++++	++++	++++	++++	++	+++	+++
	30	+++	++	+++	++++	-	-	-
	50	+	-	-	++++	-	-	-
	100	-	-	-	+++	-	-	-
Tetracycline (g/mL)	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	5	++++	++++	-	+++	-	++++	++++
	10	+++	++++	-	++	-	+++	+
	30	-	-	-	-	-	+	-
	50	-	-	-	-	-	-	-

++++: Excellent growth, +++: Well growth, ++: Good growth, +: Slight growth, -: Negative growth.

서 helper로써 virulence region을 이용할 선발 *Agrobacterium*의 항생제 내성을 조사하였다. pGA643에는 식물세포내에서 발현될 수 있는 NPT II 유전자와 미생물에서 발현될 수 있는 tetracycline 유전자가 삽입되어 있으므로(An, 1986), 선발 marker로 이용하기 위해서는 선발 *Agrobacterium*중에서 kanamycin과 tetracycline에 민감한 strain을 선발하고자 하였다. 토양중에서 선발한 *A. tumefaciens* SM042, NP061, NM023은 kanamycin 20 µg/mL에서 모두 생장이 되지 않았으나 SD021, SP021, SP101, SM021은 모두 40 µg/mL 이상의 kanamycin 농도에서도 성장하였다(Table 5). 또한 kanamycin과 마찬가지로 식물세포에서 NPT II 유전자가 발현되었을 때 저항성을 나타내는 G418의 경우에는 SM042는 20 µg/mL에서 모두 생장이 되지 않았으나, NP061과 NM023은 20 µg/mL에서 생장이 가능하였다(Table 5). 더욱이 미생물에서 선발 maker로 이용할 수 있는 tetracycline의 경우에는 SM042는 5 µg/mL에서 생장이 되지 않았으나

NP061과 NM023은 10 µg/mL 이상에서도 생존이 가능하였다(Table 5). Binary vector pGA643을 *Agrobacterium*에 도입하여 선발하고자 할 때 사용한 항생제의 농도는 kanamycin의 경우 25 µg/mL, tetracycline의 경우에는 7 µg/mL을 사용하는 바(An, 1986), 본 실험에서 선발한 균주를 virulence region 제공균주로 사용하기 위해서는 kanamycin 20 µg/mL의 농도에서도 생장이 되지 않은 SM042, NP061 그리고 NP023이 사용될 수 있으며 tetracycline 5 µg/mL에서도 생장이 되지 않은 SP101과 SM042가 사용될 수 있다. 이러한 점을 감안할 때 tri-parental mating을 이용해서 binary vector를 *Agrobacterium*에 도입하기 위해서는 *A. tumefaciens* SM042가 가장 적합하였다.

*A. tumefaciens*에 binary vector의 도입

A. tumefaciens SM042에 pGA643 binary vector를 도입한

Table 6. Survivability of different strains cultured on the various media for tri-parental mating.

Strains	Media				
	MGL	LB	LB(A)	AB	AB(A)
Acceptor <i>Agrobacterium tumefaciens</i> SM042 (containing wild-type Ti-plasmid)	O	O	X	O	X
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> PC2760 (containing disarmed Ti-plasmid)	O	O	X	O	X
Donor <i>E. coli</i> MC1000/pGA643	O	O	O	X	X
Helper <i>E. coli</i> HB101/pRK2013	O	O	O	X	XX
Conjugant <i>A. tumefaciens</i> SM643	O	O	O	O	O
<i>A. tumefaciens</i> PC643	O	O	O	O	O

LB(A): LB + tetracycline 5 g/mL and kanamycin 20 g/mL, AB(A): AB + tetracycline 7 g/mL and kanamycin 25 g/mL. O: Survived, X: Dead.

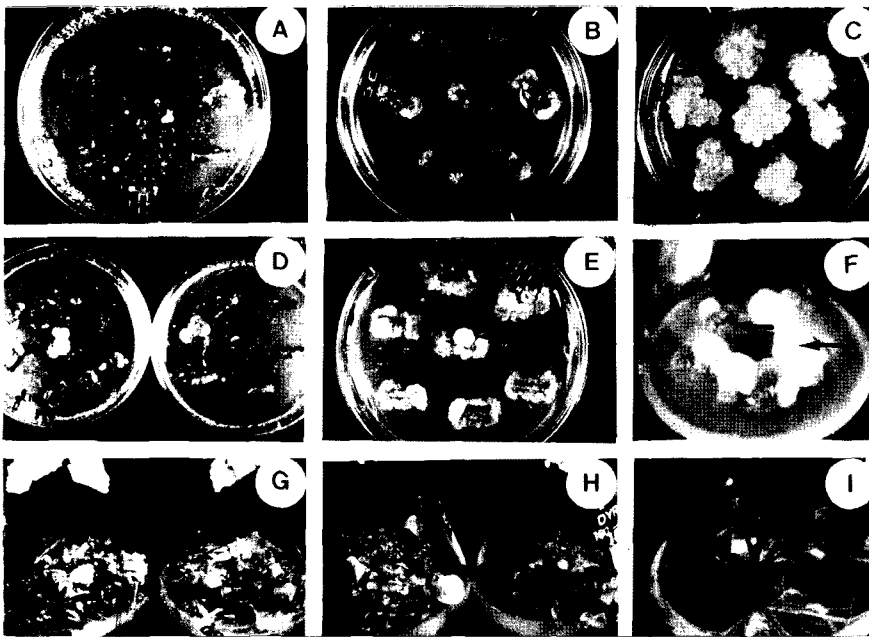


Figure 3. Transformation (A,B,D,E), culture (C,F) and regeneration (G,H,I) of tobacco with *A. tumefaciens* PC643 (A,B,C,G) and SM042 (D,E,F,H) on the media with 2,4-D 0.5 mg/L and kanamycin for callus formation. G and H are transgenic selected on medium with BA 2.5 mg/L, NAA 0.5 mg/L and kanamycin using stem explants for direct shoot formation.

conjugant를 얻기 위해서 선택항생제로써 tetracycline과 kanamycin을 사용하였으며 배지로써는 AB, MGL 및 LB배지를 사용하였다. 각종 항생제 배지에서 *Agrobacterium* spp와 *E. coli* MC1000/pGA643, 그리고 *E. coli* HB101/pRK2013의 생존여부를 조사한 결과는 Table 6과 같다. *Agrobacterium* spp는 LB 및 AB 배지에서는 생존하였으나 tetracycline과 kanamycin이 함유된 LB 및 AB 배지에서는 모두 생존하지 못했다(Table 6). 반면에 *E. coli* MC1000/pGA643은 AB 배지에서는 생존하지 못했지만 항생제가 첨가된 LB배지에서는 생존하였으며, *E. coli* HB101/pRK2013은 LB 항생제 배지와 AB 배지에서 생존하지 못했다(Table 6). 상기 결과로 tri-parental mating을 시킬 수 있는 조건이 만족되었으므로(Ditta 1980) 3 균주를 mating 시켜 항생제가 첨가된 AB 배지에서 생존하는 균주를 얻을 수 있었다(Table 6). 항생제가 첨가된 AB 배지임에도 생존이 가능한 균주는 tetracycline 유전자와 NPT II 유전자를 가지고 있는 pGA643 vector가 *Agrobacterium* spp에

도입되어 발현됨으로써 생존하는 conjugant로 판단되어 *A. tumefaciens* SM042에 pGA643 vector가 도입된 균주를 *A. tumefaciens* SM643으로 명명하였으며, disarmed Ti-plasmid 함유 *A. tumefaciens* PC2760에 pGA643 vector가 도입된 균주는 *A. tumefaciens* PC643으로 명명하였다(Table 6).

*Agrobacterium*에 의한 연초의 형질전환과 재분화

Kanamycin 저항성 유전자가 도입되어 있는 *A. tumefaciens* SM643과 *A. tumefaciens* PC643을 사용하여 연초를 형질전환시키기 위해서 *Nicotiana glauca*의 줄기와 동시 배양한 후에 carbenicillin 250 µg/mL과 kanamycin 100 µg/mL, 그리고 2,4-D 0.5 mg/L 첨가된 배지에 접종하였던 바, *Agrobacterium* strains에 의한 오염은 전혀 없었으며 줄기의 상처부위로부터 캘러스가 유기되었다(Figure 3-A,D). 그러나 *Agrobacterium*의 strain에 따라 형성된 캘러스의 양상이 다소 다르게 나타났는데 *A. tumefaciens* PC643(Figure 3-A)

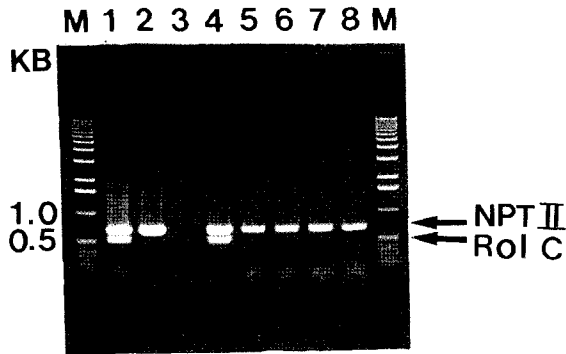


Figure 4. PCR products of NPT II (700 bp) and Rol C (500 bp) genes from *A. tumefaciens* SM643 (lane 1), *A. tumefaciens* PC643 (lane 2), and normal callus (lane 3), transgenic tight round callus by SM643 (lane 4), transgenic friable callus by SM643 (lane 5), transgenic friable callus by PC643 (lane 6), transgenic plant by SM643 (lane 7), and transgenic plant by PC643 (lane 8) in tobacco.

에 의해서 형질전환된 캘러스는 매우 friable한 상태로만 유지되었는데 토양중에서 선발했던 *A. tumefaciens* SM643(Figure 3-D)에 의해서 형질전환된 캘러스는 friable한 상태와 미색의 딱딱하고 둥그런 형태의 캘러스가 동시에 유도되었다. 이런 현상은 kanamycin의 농도를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 낮추었을 때 미색의 딱딱하고 둥그런 형태의 캘러스가 더 심하게 나타나는 현상을 보였으며 캘러스의 유기 및 성장량도 많았고, 특히 형질전환된 캘러스의 유도율이 *A. tumefaciens* PC643에 비해서 *A. tumefaciens* SM643이 더 양호한 경향을 보였다(Figure 3-B,E). 이렇게 균주간에 형성된 캘러스의 형태에 차이가 나는 것은 *A. tumefaciens* PC643의 경우에는 disarmed된 Ti-plasmid이므로 단순히 binary vector에 삽입되어 있는 NPT II 유전자만이 식물세포내로 도입되어 외부에서 첨가된 식물호르몬의 영향으로 캘러스가 friable한 상태가 되었겠지만 *A. tumefaciens* SM643의 경우에는 Ti-plasmid내에 T-DNA가 그대로 존재하기 때문에 형질전환시 NPT II 유전자 뿐만 아니라 T-DNA도 동시에 삽입되었을 가능성도 있다. 더욱이 둥그런 미색의 단단한 캘러스는 T-DNA에 의해 나타나는 tumor 캘러스의 특성과 비슷하므로(Choi and Yang, 1986), 고농도의 kanamycin이 첨가된 식물호르몬 무첨가배지에 배양한 결과 역시 반구형의 전형적인 tumor 캘러스로 성장하였으며, 일부 캘러스는 성장하지 못하고 고사하였다(Figure 3-F). 반면 friable한 캘러스는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin이 첨가된 식물호르몬 무첨가 배지에서 성장하지 못하였지만 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin과 2,4-D 0.5 mg/L 첨가된 배지에서는 매우 왕성히 성장하였다(Figure 3-C). 이런 점으로 보아 반구형으로 성장한 tumor 캘러스는 wild-type T-DNA와 NPT II 유전자가 동시에 삽입된 것으로 생각되며 friable한 캘러스는 NPT II 유전자만이 도입된 것으로 우선 판단된다.

Table 7. Effect of BA on the shoot formation from friable callus transformed by NPT II gene on the MS medium with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin.

Conc. of BA(mg/L)	Shoot formation(%)	
	PC643	SM042
0	0	0
0.5	53.3	48.2
1.0	66.7	39.4
2.0	73.3	65.2
2.5	81.3	65.8

따라서 형질전환된 3종의 캘러스에서 도입한 유전자가 삽입되어 있는지를 확인하기 위해서 DNA를 추출하여 PCR에 의해 Rol C 유전자와 NPT II 유전자의 존재여부를 조사하였던 바, 역시 반구형의 단단한 캘러스에서는 500bp의 Rol C 유전자절편과 700bp의 NPT II 유전자절편이 확인되었다(Figure 4, lane 4). 그러나 2종의 균주에 의해서 유도된 캘러스중에서 friable하게 성장한 캘러스에서는 전혀 Rol C 유전자가 확인되지 않고 NPT II 유전자절편만이 확인되었다(Figure 4, lanes 5,6). 또한 대조구로 사용한 normal 연초식물체에서는 전혀 band가 확인되지 않았으며(Figure 4, lane 3), 토양에서 선발한 *A. tumefaciens* SM042에서 추출한 DNA를 이용하여 PCR를 할 경우에는 공히 NPT II 유전자와 Rol C 유전자절편이 확인되었으나(Figure 4, lane 1), PC643균주에서는 NPT II 유전자절편만이 확인되었다(Figure 4, lane 2).

형질전환된 캘러스에서 재분화를 시키기 위해서 PC643에 의해서 유도된 단단하고 둥그런 tumor type의 callus에서는 전혀 shoot가 형성되지 않았다. 그러나 SM042와 PC643에서 유도된 friable한 캘러스는 NAA 0.5 mg/L, BA 2.5 mg/L가 첨가된 kanamycin 배지에서 최초에는 shoot가 형성되지 않았으나 다시 BA가 농도별로 첨가된 배지에 재치상하였을 때에는 shoot가 형성되었으며 BA 2.5 mg/L 첨가배지에서 가장 양호한 경향을 보였고 PC643에서 유도된 캘러스가 SM042에서 유도된 캘러스보다 재분화율이 더 높은 경향을 보였다(Table 7). 본 실험에서 tumor type callus에서는 전혀 shoot의 형성이 되지 않았는데 이런 callus는 NPT II 유전자와 Rol C 유전자가 동시에 삽입되어 있어(Figure 4), Rol C 유전자에 의해서 과잉 형성된 식물호르몬에 의해서 재분화가 되지 않은 것으로 사료되며, 이미 형질전환시 wild-type Ti-plasmid를 사용할 경우 T-DNA내에 삽입되어있는 식물호르몬 자가합성 유전자에 의해서 만들어지는 teratoma형 재분화체때문에 정상적인 뿌리를 가지고 있는 shoot를 획득하기가 어려웠다고 보고되어 있다(Braun and Wood, 1976; Yang and Choi, 1991). 따라서 wild-type T-DNA에 의하여 형질전환된 조직에서 재분화를 시키고자 많은 시도가 있었는데, 토양에서 분리한 일부균주에서(Choi and Yang,

1986), 반수체 식물체(Song et al., 1987), 그리고 *A. rhizogenes* 를 이용할 경우에는 정상적인 재분화체를 획득할 수 있었으나(White, 1982), target 유전자와 함께 T-DNA가 도입되어 재분화된 보고는 없는 것 같다. 이에 식물호르몬 자가합성 유전자가 제거된 disarmed Ti-plasmid(Fraley et al., 1985; Hamil et al., 1987)를 사용함으로써 조직내에서 식물호르몬의 과잉생산이 없어져 외부에서 추가로 첨가한 식물호르몬에 의해 영향을 받음으로서 재분화를 가능하게 하였으며 최근 식물유전공학 분야에 매우 많이 사용하고 있다. 그러나 본 실험에서와 같이 disarmed Ti-plasmid를 사용하지 않고도 kanamycin 저항성 유전자를 도입하기 위해서 wild-type *Agrobacterium*를 그대로 사용하여도 가능하지만 이때에는 반듯이 friable한 callus를 선발함으로써 T-DNA의 도입에 의하여 일어나는 단단하며 둥그런 형태의 callus를 제거하는 것이 필요하다고 생각된다.

한편 연초조직에 형질전환을 유도할 때 캘러스를 형성시키지 않고 직접 shoot를 형성하기 위해서 *Agrobacterium* 균주와 연초의 줄기를 동시배양한 후 carbenicillin 250 µg/mL 과 kanamycin 100 µg/mL 그리고 NAA 0.5 mg/L, BA 2.5mg/L를 첨가한 MS배지에 접종하였던 바, callus의 유도 배지와는 달리 두종의 균주 공히 90% 이상 shoot가 형성되었으며 정상적인 생장이 가능하였다. 그러나 shoot의 수는 PC643(Figure 3-G)에 비해 SM643(Figure 3-H)에서 더 많은 경향을 보였으나 SM643에서는 기형의 shoot가 다소 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3-H). 그러나 두종의 균주에서 형성된 shoot를 다시 NAA가 0.1 mg/L 첨가된 식물호르몬 무첨가 배지에 이식할 경우 정상적인 뿌리를 가진 식물체로 성장하였다(Figure 3-I). 또한 이렇게 성장한 정상 식물체로부터 Rol C 및 NPT II 유전자의 도입여부를 PCR을 이용하여 조사한 결과 모두 NPT II 유전자의 절편은 함유하고 있었으나 Rol C 유전자의 절편은 나타나지 않았다(Figure 4, lanes 7,8). 이런 결과는 wild-type Ti-plasmid를 사용하더라도 재분화배지를 사용해서 나온 형질전환체가 정상적인 뿌리를 가진 식물체라면 target 유전자만 도입할 수 있음을 의미한다. 따라서 본 실험에서 선발한 *A. tumefaciens* SM042는 기주범위등에 대해서 많은 조사를 해야 하겠지만 우선 연초에서 hypervirulent 균주로 나타났으며 정상적인 형질전환식물체를 획득할 수 있어 타작물에서도 형질전환에 활용이 가능할 것으로 생각된다.

적 요

한국에서 자생한 자연산 tumor 조직과 근권토양으로부터 형질전환율이 높은 hypervirulent *Agrobacterium* spp를 분리하기 위해서 *Salix*, *Diospyros*, *Populus* 및 *Malus*에서 형성된 tumor 조직과 근권토양을 채취하여 Schroth 선택배지와

New and Kerr 배지를 이용하여 78 균주의 colony를 특성에 따라 분리하였다. 이 중에서 48 균주가 당근 disc에서 tumor를 형성하였으며 tumor를 형성한 균주중 형성시기가 빠르며 크기가 커 hypervirulent 균주로 생각되는 *A. tumefaciens* SP101을 biotype 1, 그리고 *A. tumefaciens* SM042를 biotype 2로 동정하였다. 토양중에서 선발한 *A. tumefaciens* SM042와 disarmed *A. tumefaciens* PC2760에 kanamycin 저항성 유전자를 함유하고 있는 binary vector pGA643을 도입하여 conjugant인 *A. tumefaciens* SM643과 *A. tumefaciens* PC643을 kanamycin과 tetracycline이 함유된 최소배지에서 획득하였다. 연초의 형질전환을 위해서 conjugant *Agrobacterium*과 연초조직을 동시배양 후 24-D와 kanamycin이 함유된 선발배지에 치상하여 형질전환을 유도한 결과 *A. tumefaciens* SM643이 *A. tumefaciens* PC643보다 더 많은 캘러스가 형성되었다. 그러나 *A. tumefaciens* PC643을 사용한 형질전환 캘러스는 대부분 friable한 캘러스로 유도되었으며 정상적으로 식물체로 성장하였으나 *A. tumefaciens* SM643을 사용한 캘러스는 매우 딱딱하며 둥그런 형태의 캘러스와 friable한 캘러스가 혼재한 상태로 성장하였으며, 이 중에서 friable한 캘러스는 정상적인 shoot가 형성되었으나 딱딱한 캘러스로 유도된 형질전환체는 식물체로 형성되지 않고 반구형 미색의 전형적인 tumor 캘러스로 성장하였다. 한편 형질전환시 캘러스를 유도하지 않고 직접 shoot를 형성시킨 결과 disarmed Ti-plasmid를 사용하지 않고 wild-type Ti-plasmid를 사용해도 정상적인 형질전환체를 획득할 수 있었다.

인용문헌

- An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* 153: 292-305
- An G, Watson BD, Chiang CC (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti-vector system. *Plant Physiol* 81: 301-305
- Ark PA, Schroth MN (1958) Use of slices of carrot and other fleshy roots to detect crown gall bacteria in soil. *Plant Disease Reporter* 42: 1279-1281
- Braun AC, Wood HN (1976) Suppression of the neoplastic state with the acquisition of specialized functions in cells, tissues and organs of crown gall teratomas of tobacco. *Proc Natl Acad Sci* 73: 496-500
- Bergey's manual of systematic bacteriology (1984) Vol 1 Williams & Wilkins, Baltimore pp 244-254
- Bernaerts MJ, Ley JD (1963) A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* 197: 406-407
- Chiton MD, Tepter DA, Petit A, David C, Tempe J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295: 432-434

- Choi KT, Yang DC** (1986) Shoot formation from crown gall tumor of *Nicotiana tabacum* L and characteristics of regenerants. Korean J Plant Tissue Culture **13**: 51-59
- Clark AG** (1969) A selective medium for the isolation of *Agrobacterium* species. J of App Bacteriol **32**: 348-351
- De Cleene M, Ley JD** (1976) The host range of crown gall. Botanical Review **42**: 389-466
- Ditta G** (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci **77**: 7347-7351
- Edwards KC, Johnson C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res **19**: 1349
- Fralely R, Rogers S, Horsch R, Eichlotz D, Flick J, Hoffman N, Snaders P** (1985) The SEV system : A new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. Bio/technology **3**: 629-635
- Graham PH, Parker CA** (1964) Diagnostic feature in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. Plant and Soil **20**: 383-396
- Hayward AC** (1964) Characteristics of *Pseudomonas sedaneae*. J Appl Bacteriol **27**: 265-277
- Hamill JD, Prescott A, Martin C** (1987) Assessment of the T-DNA of disarmed binary vectors derived from *Agrobacterium tumefaciens* and the T-DNA of *A. rhizogenes*. Plant Mol Biol **9**: 574-584
- Hoekema A, Horsch A, Hooykaas P, Schilperoort R** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature **303**: 179-180
- Hood EE, Helmer GL, Fralely RT, Chilton MD** (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiB0542 outside of T-DNA. J Bacteriology **168**: 1291-1301
- Jin ST, Gordon MP, Nester EW** (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. J Bacteriology **169**: 4417-4425
- Kado CI, Heskeff MG** (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Anthomonas*. Phytopathology **60**: 969-976
- Keane PJ, Kerr A, New PB** (1970) Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium isolates*. Aust J Biol Sci **23**: 585-595
- New PB, Kerr A** (1971) A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. J Appl Bacteriol **34**: 233-236
- Oono Y, Suzuki T, Toki S, Uchimiya H** (1993) Effects of the over-expression of the rolC gene on leaf development in transgenic periclinal chimeric plants. Plant Cell Physiol **34**: 745-752
- Patel MK** (1926) An improved method of isolating *Pseudomonas tumefaciens*. Phytopathology **16**: 577-580
- Schroth MN, Thompson JP, Hildebrand DC** (1965) Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* - *A. radiobacter* group from soil. Phytopathology **55**: 645-647
- Simmons JS** (1926) A culture medium for differentiating organisms of the typhoid-colony aerogenes groups and for isolation of certain fungi. J of Infectious Disease **39**: 209-214
- Simpson R** (1986) A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* functions in *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Mol Biol **6**: 403-415
- Song, YJ, Yang DC, Choi KT, Kim JH** (1987) Characteristics and regeneration of crown gall tumor callus derived from *Nicotiana tabacum* L. haploid plant. Korean J Breed **19**: 308-313
- Stachel S, Zambryski P** (1986) VirA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. Cell **46**: 325-333
- White FF, Ghidossi G, Gordon MP, Nester EW** (1982) Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. Proc Natl Acad Sci **79**: 3193-3197
- Yang DC, Choi KT** (1991) Growth characteristics of teratoma shoot derived from crown gall callus of *Nicotiana tabacum* cv. NC2326. J Korean Society of Tobacco Science **13**: 36-42

(1998년 3월 17일 접수)