

Agrobacterium tumefaciens KU12내에 존재하는 Octopine Type Ti Plasmid의 확인

이용욱 · 음진성¹ · 심웅섭*

고려대학교 이과대학 생물학과, ¹목원대학교 이공대학 미생물학과

국내에서 분리된 *Agrobacterium tumefaciens* KU12는 많은 식물체에서 종양을 유발하며 octopine을 유일한 탄소원과 질소원으로 이용할 수 있다. *A. tumefaciens* KU12내에는 크기가 각각 45.5 kb, 240 kb 및 240 kb 이상인 3종류의 플라스미드가 존재하는 것으로 확인되었다. KU12내에 존재하는 octopine type Ti plasmid를 확인하기 위하여 플라스미드를 가지고 있지 않은 *A. tumefaciens* A136을 direct transformation방법에 따라 KU12에서 분리한 플라스미드 시료로 형질전환시킨 후 질소원으로 octopine만을 가지고 있는 AB 최소배지를 이용하여 Ti plasmid에 의해 형질전환된 형질전환체를 선별하였다. 선별된 형질전환체를 *A. tumefaciens* KU911이라고 명명하였으며, KU911내에는 240 kb 크기의 플라스미드만이 존재하였다. 종양형성능 및 Southern hybridization을 이용하여 octopine type Ti plasmid인 pTiAch5와의 동질성을 조사한 결과, KU12 내에 존재하는 3종류의 플라스미드중 pTiKU12로 명명된 240 kb 크기의 플라스미드가 Ti plasmid임이 확인되었다.

KEY WORDS □ *A. tumefaciens* KU12, pTiKU12, octopine type Ti plasmid, direct transformation

*Agrobacterium tumefaciens*는 Rhizobiaceae과에 속하는 Gram negative인 토양세균(19)으로 많은 종류의 쌍자엽 식물과 소수의 제한된 단자엽식물체의 상처부위가 이들에 의해 감염되면 crown gall이라는 종양이 형성된다(4, 8, 9, 14, 24). 종양을 유발할 수 있는 *Agrobacterium* 내에는 크기가 200~250 kb에 달하는 큰 플라스미드가 존재하는데(30, 31), 이 플라스미드를 제거시키면 종양형성능이 소실되고(29, 31), 소실된 균주에 conjugation 방법으로 다시 플라스미드를 도입시키면 종양형성능이 회복된다(6, 30). 이와 같이 *Agrobacterium*내에 존재하며 종양형성의 원인이 되는 플라스미드를 Ti(Tumor inducing) plasmid라고 하고, crown gall은 T-DNA(transferred DNA)라고 부르는 Ti plasmid의 일부분이 식물체내의 염색체내로 전달·삽입된 후 오옥신과 사이토키닌같은 식물성장호르몬을 과도하게 생산하여 비정상적인 세포의 증식을 일으키기 때문에 발생한다. 따라서 *in vitro*에서 정상적인 식물체의 성장과 분화에 있어 필수적인 오옥신과 사이토키닌같은 phytohormone이 결핍된 배지에서도 crown gall은 정상적인 성장이 가능하며 또 완전한 식물체로의 재생도 가능하다(3, 28). 또한 T-DNA내에는 이들 유전자 이외에도 basic amino acid 유도체인 opine의 합성에 필요한 opine synthase gene이 포함되어 있어 특정 opine의 합성이 유도되는데(23). 이렇게 합성된 opine은 opine을 분해하는데 필요한 유전자가 Ti plasmid내에만 존재

하기 때문에 식물체나 다른 미생물에 의해서는 이용되지 못하고 Ti plasmid를 가지고 있는 *Agrobacterium*에 의해서만 영양원으로 이용된다(27). Opine의 종류로는 octopine, nopaline, succinamopine 등이 알려져 있으며(2, 13) crown gall에서 합성되는 opine의 type은 식물체에 의해서가 아니라 감염된 *Agrobacterium*내에 존재하는 Ti plasmid에 따라 결정되므로(21), 이들 opine type은 *Agrobacterium*을 분류하는 일차적인 기준으로 사용된다(25).

Opine의 일종인 octopine을 질소원 및 탄소원으로 이용할 수 있는 국내에서 분리 동정된 균주인 *A. tumefaciens* KU12의 종양형성능, 고등식물에 대한 숙주범위 및 phenolic compound에 의한 vir 유전자의 발현과정을 외국에서 분리 동정되어 지금까지 연구에 사용된 *Agrobacterium* 균주들과 비교하였을 때 다음과 같은 차이점을 나타내었다. 첫째, 28종의 쌍자엽 식물체에 대한 종양형성능을 조사한 결과 super virulent 균주로 알려진 *A. tumefaciens* A348은 14종의 식물체에서 종양을 유도한 반면 KU12는 19종의 식물체에서 종양을 유도하였는데, 이것은 KU12가 A348 균주보다 넓은 숙주범위를 가지고 있다는 것을 의미하는 것이다(5, 7, 15). 둘째, phenolic compound에 의한 vir 유전자의 발현과정에서 phenolic compound내 benzene 고리의 3' 위치에 methoxy group이 존재할 때, 다른 *Agrobacterium* 균주들내 vir 유전자의 발현에는 영향이 없었으나 KU12내에 존재

하는 *vir* 유전자의 발현은 억제되었다(17). 셋째, phenolic compound의 일종인 acetosyringone에 의해 다른 *Agrobacterium* 균주들내의 *vir* 유전자는 발현이 활발히 유도된 반면, KU12내에 존재하는 *vir* 유전자의 발현은 거의 유도되지 않았다(17).

본 연구에서는 지금까지의 연구결과 나타난 이러한 차이점에 대한 원인을 분자수준에서 규명하기 위하여 일차적으로 *A. tumefaciens* KU12내에 존재하고 있는 플라스미드의 종류를 조사하였으며, 그 중에서 octopine type Ti plasmid를 확인하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주인 *A. tumefaciens* A136은 *A. tumefaciens* C58 균주에서 nopaline type Ti plasmid인 pTiC58이 제거된 균주이고(31), *A. tumefaciens* Ach5는 octopine type Ti plasmid인 pTiAch5를 가지고 있는 균주(10)로서 E.W. Nester (University of Washington, Seattle)에게서 분양받았으며, *A. tumefaciens* KU12는 국내에서 분리된 균주이다(5). 이들 균주는 MG/L 배지(1 l당 trypton 5g, yeast extract 2.5g, NaCl 5g, mannitol 5g, sodium glutamate 1.16g, KH_2PO_4 0.25g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, biotin 1 μg , pH 7.0)와 AB 최소배지(1 l당 NH_4Cl 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, KCl 0.15g, CaCl_2 0.01g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg, K_2HPO_4 3g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.3g, glucose 5g)를 사용하여 28°C에서 배양하였다.

*Agrobacterium*내에 존재하는 플라스미드의 조사

*Agrobacterium*내에 존재하는 플라스미드 종류의 확인은 Eckhardt(11)의 방법을 변형하여 사용하였다. *Agrobacterium*을 MG/L 배지에 접종하여 28°C에서 600 nm에서의 흡광도가 0.8 정도가 될 때까지 진탕 배양한 후 1 ml를 Eppendorf tube에 옮겨 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체에 50 μl 의 lysozyme mixture(RNaseA 0.1 mg/ml, sucrose 200 mg/ml, lysozyme 2 mg/ml)를 부가하여 현탁시킨 후 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 준비된 0.7% TBE (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA) agarose gel의 well에 30 μl 의 SDS lysing solution(0.2% SDS, 5% sucrose, 0.05% bromophenol blue in TBE)을 부가하여 10분간 방치한 다음, 37°C에서 방치시킨 시료 20 μl 를 조심스럽게 부가하였다. Well의 나머지부분을 TBE buffer로 시료가 섞이지 않도록 조심스럽게 채운 다음 vertical electrophoresis kit (Hoefer SE 600)를 이용하여 14 V에서 90분간 전기영동한 후 접압을 150 V로 올려 다시 90분간 전기영동하였다. 전기영동이 종료된 다음 ethidium bromide(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 포함된 증류수에서 30분간 방치하여 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 관찰하였다.

플라스미드의 분리

플라스미드의 분리는 Marco 등(20)의 방법을 변형하여 사용하였다. *Agrobacterium* 균주를 플라스미드의 조사 때와 동일하게 배양한 다음 원심분리하여 균체를 회수하였다. 배양액 1 l당 29 ml의 Sol. I(50 mM glucose, 25 mM Tris·Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA) 용액을 부가하여 현탁시킨 후 1 ml의 lysozyme 용액(20 mg/ml in Sol. I)을 부가 혼합하여 0°C에서 1시간 동안 방치하였다. 여기에 60 ml의 Sol. II(0.1 N NaOH, 1% SDS)용액을 가하여 혼합하고 상온에서 10분간 방치하였다. 45 ml의 Sol. III(3 M sodium acetate, pH 4.8)용액을 다시 부가하여 완전히 혼합한 다음, 0°C에서 1시간 동안 방치한 후 12,000 $\times g$ 에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액에 0.6배에 해당되는 isopropanol을 부가하여 상온에서 20분간 방치한 다음, 원심분리하여 DNA 침전물을 회수하였다. 회수된 DNA 침전물을 CsCl 밀도 구배 초원심분리법에 따라 원심분리하여 플라스미드를 정제하였다.

Direct transformation

A. tumefaciens KU12에서 분리한 플라스미드 시료를 이용한 *A. tumefaciens* A136의 direct transformation은 An(1)의 방법을 이용하여 실시하였다. An의 방법에 따라 제조된 competent cell 200 μl 당 KU12에서 분리한 플라스미드 시료 1 μg 을 부가 혼합하여 형질전환시킨 후, 질소원으로 NH_4Cl 대신 octopine(0.1% w/v)이 첨가된 AB 최소배지에서 3일간 배양하여 KU12내에 존재하는 octopine type Ti plasmid에 의해 형질전환된 형질전환체를 선별하였다.

Leaf disc transformation

담배(*Nicotiana tabacum* NC82)를 이용한 *Agrobacterium*의 종양형성능은 leaf disc transformation 방법을 이용하여 조사하였다. 담배잎을 절취하여 5.25% sodium hypochlorite용액에 15분간 담가 살균한 다음, 멸균한 증류수로 4회 세척한 후 약 0.5~1 cm^2 정도의 크기로 절단하였다. 절단된 leaf disc 10~20 개를 종양형성능을 조사하고자 하는 *Agrobacterium* 균주들이 포함되어 있는 MS 배지(22)에 완전히 잠기지 않도록 조심하여 넣은 후 25°C의 암처에서 2일간 방치하였다. 암처리한 leaf disc는 멸균한 휴지를 이용하여 묻어있는 MS 배지를 완전히 제거한 후 carbenicillin이 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 포함되어 있는 MS plate에 옮겨, 25°C에서 18시간의 빛을 주어 배양하며 종양이 형성되는가를 관찰하였다.

Southern hybridization

pTiKU12와 pTiAch5의 동질성은 Southern(26)의 방법에 따라 hybridization을 실시하여 확인하였다. *A. tumefaciens* Ach5에서 분리한 pTiAch5를 제한효소로 처리한 다음 nick translation kit(Bethesda Research Laboratories)를 이용하여 ^{32}P 로 표지하여 탐침을 제조하였다.

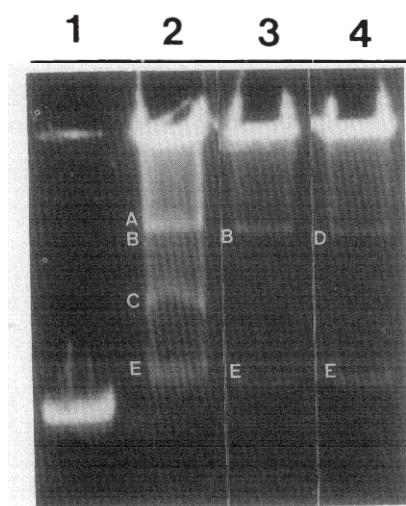


Fig. 1. Plasmids of *Agrobacterium* strain KU12, KU 911, KU12C1 and Ach5 isolated by using the modified Ekhardt(1978) procedure.

Electrophoresis was carried out on 0.7% TBE vertical agarose gel. Lane 1, λ DNA; lane 2, KU12; lane 3, KU911; lane 4, Ach5. Band A, cryptic plasmid; band B, pTiKU12; band C, pTi12; band D, pTiAch5; band E, chromosomal DNA.

결과 및 고찰

A. tumefaciens KU12내에 존재하는 플라스미드의 확인

일반적인 방법을 이용하여 KU12에서 분리한 플라스미드 시료를 전기영동하면 45.5 kb 크기의 플라스미드만이 확인되었는데, 이것은 플라스미드를 분리하는 과정에서 크기가 큰 플라스미드가 모두 기계적으로 절단되었기 때문으로 사료된다. 따라서 플라스미드를 분리하는 과정에서 일어나는 기계적인 작용에 의한 절단을 배제하기 위하여 균체를 agarose gel의 well 상에서 lysis시킨 후 전기영동하는 Ekhardt(11)의 방법을 이용하여 KU12내에 존재하는 플라스미드의 종류를 확인하였다. 그러나 Ekhardt의 방법에 따라 배양한 균체를 사용한 경우에는 플라스미드를 분리할 수 없었는데, 이것은 배양을 오래하여 균체가 노화되어 lysis가 완전히 일어나지 않았기 때문이라 생각된다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 균체를 600 nm에서의 흡광도값이 0.8에 이를 때까지 배양한 후 플라스미드를 분리하는 재료로 사용한 결과, *A. tumefaciens* KU12내에는 3종류의 플라스미드가 존재하는 것으로 확인되었으며(Fig. 1, lane 2), *Agrobacterium* 균주내에는 하나 이상의 커다란 플라스미드가 존재한다는 보고(32)와 일치한다. 확인된 플라스미드 중 제일 작은 45.5 kb 크기의 플라스미드는 pTi12로, 두번째 240 kb 크기의 플라스미드는 pTiKU12

Table 1. Molecular sizes of *Bam*HI fragments of pTi12 and pTiKU12.

pTi12		pTiKU12	
Fragment No.	Kb	Fragment No.	Kb
1	18.0	1	25.1
2	4.9	2	22.6
3	4.8	3	17.0
4	4.6	4	13.5
5	3.3	5ab	12.7
6	3.1	6	10.9
7	2.7	7	8.5
8	2.03	8	8.1
9	1.48	9	7.9
10	0.56	10	7.5
		11	6.75
		12ab	6.5
		13	6.0
		14	5.4
		15ab	5.0
		16	4.95
		17	4.6
		18	4.2
		19	4.0
		20	3.95
		21	3.58
		22	3.32
		23	2.95
		24ab	2.83
		25	2.57
		26	2.42
		27	2.21
		28	1.78
		29	1.6
		30ab	1.35
		31	1.05
		32	0.9
sum	45.47		240.09

라고 명명하였으며, 이들 플라스미드의 크기는 Fig. 2의 lane 2 및 3에서 볼 수 있는 *Bam*HI로 처리하였을 때 나타난 절편들의 크기를 합하여 결정하였으며 각 절편들의 크기는 Table 1과 같다. 또한 대조구로 사용한 193.65 kb 크기의 pTiAch5 및 pTiKU12와 비교하여 볼 때(Fig. 1, lane 4) KU12내에 존재하는 가장 큰 첫번째 cryptic 플라스미드의 크기는 240 kb 이상인 것으로 추정된다.

Direct transformation에 의한 형질전환체의 제조

A. tumefaciens KU12내에 존재하는 3종류의 플라스미드 중 어느 것이 Ti plasmid인가를 확인하기 위하여 arginine 유도체인 octopine (N^2 -(D-1-carboxyethyl)-L-arginine)이 Ti plasmid에 의해서만 이용이 가능하다는 사실(27)을 이용하였다. KU12로부터 플라스미드의 분리방법에 따라 분리된 3종류의 플라스미드

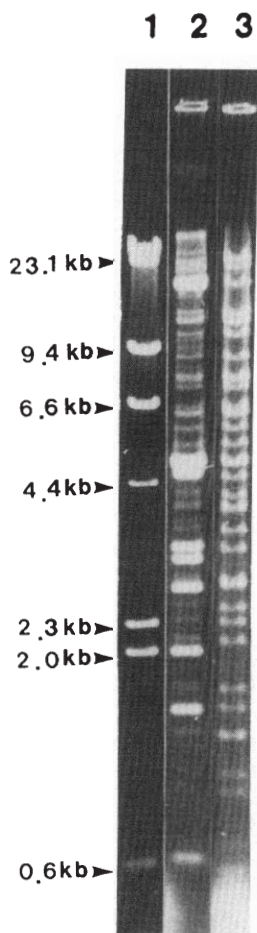


Fig. 2. Identification of plasmids isolated from *A. tumefaciens* KU911.

Lane 1, λ DNA digested with *Hind*III; lane 2, *Bam*HI fragments of plasmids isolated from KU12; lane 3, *Bam*HI fragments of plasmid isolated from KU911.

가 모두 포함되어 있는 플라스미드 시료(Fig. 2, lane 2)를 플라스미드를 가지고 있지 않은 *A. tumefaciens* A136에 direct transformation 방법으로 형질전환시킨 후 질소원으로 octopine만을 가지고 있는 AB 한천배지를 이용하여 KU12내에 존재하는 octopine type Ti plasmid에 의해 형질전환된 형질전환체를 선별하였다. 선별된 형질전환체를 *A. tumefaciens* KU911이라고 명명하였으며, KU911로부터 분리된 플라스미드 시료를 제한효소 *Bam*HI으로 절단시킨 후 전기영동한 결과는 Fig. 2의 lane 3과 같다. 또 Eckhardt의 방법을 변형하여 조사하였을 때 KU911 내에는 KU12내에 존재하는 플라스미드중 2번째의 크기를 가지는 pTiKU12만이 존재하는 것으로 확인되었으므로(Fig. 1, lane 3), KU12내에 존재하는 3종

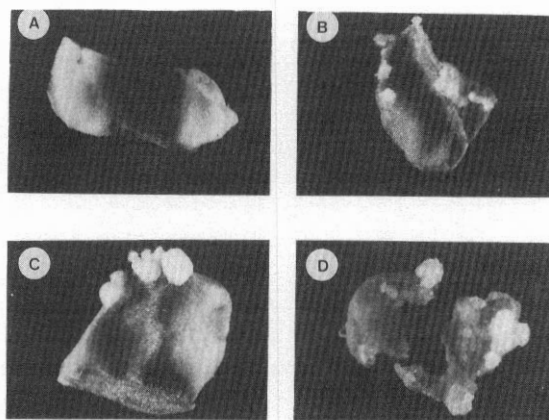


Fig. 3. Leaf disc transformation.

Discs inoculated with *A. tumefaciens* were cultured on hormone-free MS (carbenicillin 250 μ g/ml) medium. Appearance of leaf discs after 4 weeks culture. A, disc inoculated with A136 (avrulent strain); B, disc inoculated with KU12 (pTi12 and pTiKU12); C, disc inoculated with KU911 (pTiKU12); D, disc inoculated with Ach5 (pTiAch5).

류의 플라스미드중 pTiKU12가 Ti plasmid이고 Fig. 2의 lane 3에서 나타난 제한효소 절편들은 모두 pTiKU12에서 유래된 것으로 사료된다. 지금까지 Ti plasmid를 가지고 있는 *Agrobacterium* 균주로부터 플라스미드를 가지고 있지 않은 *Agrobacterium* 균주로 Ti plasmid를 이동시킬 때는 conjugation 방법을 사용되었지만(16, 30, 31), KU12와 A136은 특성이 서로 비슷하여 혼합되었을 때 다시 분리하는 것이 기술적으로 용이하지 않기 때문에, 본 연구에서는 Ti plasmid의 크기가 200~250 kb에 이르는 매우 큰 플라스미드라는 보고에도 불구하고 direct transformation으로 직접 형질전환시키는 방법을 이용하여 형질전환체를 제조하였다. pTiKU12가 240 kb 내외의 크기를 갖고 있음에도 불구하고 direct transformation 방법에 의해 위와같이 정상적으로 숙주세포내로 전달된 것은, 크기가 매우 큰 플라스미드를 형질전환 시키고자할 때에도 시간이 많이 필요하고 여러종류의 혼합된 균주들 중에서 형질전환된 균주만을 선별해야 하는 conjugation방법 이외에도, 형질전환체 제조과정이 간단한 direct transformation방법이 사용될 수 있다는 것을 의미하는 것이다. 또 질소고정에 관여하는 *Rhizobium*은 *Agrobacterium*과 같은 과에 속하며 매우 유사한 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로, *Rhizobium*의 경우에도 direct transformation에 의한 플라스미드의 형질전환이 이용될 수 있으리라 사료된다.

A. *tumefaciens* KU911의 종양형성능 조사

A. tumefaciens KU911내에 존재하는 pTiKU12가 Ti plasmid의 특징인 종양을 형성할 수 있는가를

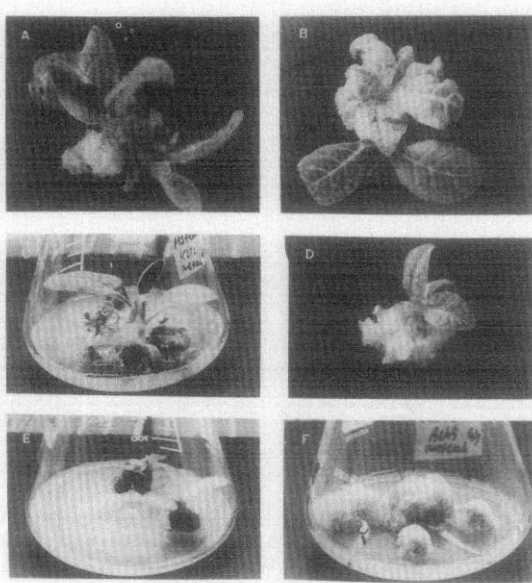


Fig. 4. Shoots formation from tumor induced by *A. tumefaciens* KU12 and KU911. Tumors cut off from leaf disc were sub-cultured on hormone-free MS (carbenicillin 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) medium. A, B, and C, tumors induced by *A. tumefaciens* KU12; D and E, tumors induced by *A. tumefaciens* KU911; F, proliferation of tumor induced by *A. tumefaciens* Ach5; A, B, and D, close-up of tumor after 6 weeks culture; C, E, and F, appearance of tumors after 10 weeks culture.

확인하기 위하여 담배를 이용하여 leaf disc transformation방법에 따라 종양형성능을 조사한 결과, 호르몬이 포함되어 있지않은 MS배지에서 Ti plasmid를 가지고 있지 않은 A136에 의해서는 종양이 형성되지 않았으나(Fig. 3A), KU911과 KU12는 super virulent strain으로 알려진 Ach5처럼 종양을 형성하였다(Fig. 3B, C and D). 그러나 Ach5에 의해 유도된 종양은 계속 증식하였으나(Fig. 4F), KU12와 KU911에 의해 유도된 종양은 종양의 크기가 3~5 mm 정도에 이르면 종양의 성장은 정지되고 shoot가 형성되었다(Fig. 4A-E). 그리고 KU12와 KU911에 의해 유도된 종양에서 형성된 shoot가 어느정도 성장한 후 절단하여 호르몬이 없는 MS배지에 재배양하면 뿌리가 형성되었고, 화분에 옮겨 심어 배양하면 정상적으로 성장(Fig. 5A and C) 개화(Fig. 5B and D) 하였으며 종자를 형성하였다. KU12에 의해 감자에서 유도된 종양의 경우에도 동일하게 shoot가 형성된 Chung과 Sim(7)의 결과에 비추어 볼 때, KU12와 KU911에 의해 유도된 종양에서 형성된 shoot는 crown gall이 유도된 식물체에 의해서가 아니라, KU12와 KU911내에 존재하는 Ti plasmid인 pTiKU12

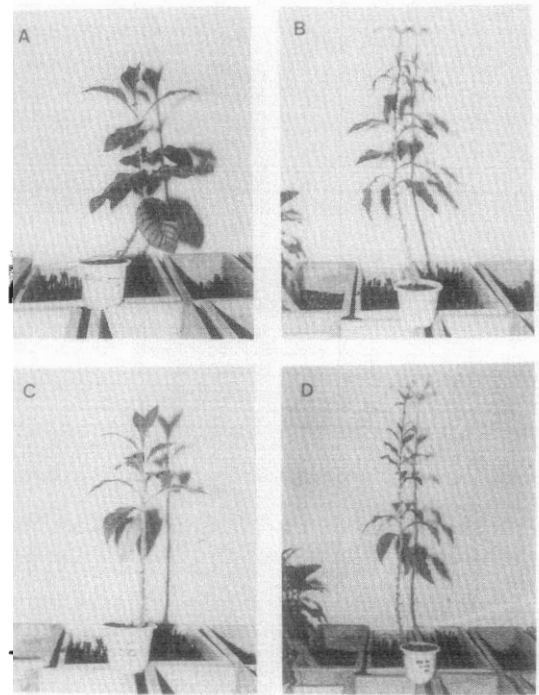


Fig. 5. Tumor-derived plants growing in pot. Appearance of plants after 8 months culture. A and B, plants induced by *A. tumefaciens* KU12; C and D, plants induced by *A. tumefaciens* KU911.

에서 식물체의 염색체내로 전달된 T-DNA에 의해 형성되었음을 의미하는 것이다. Leemans 등(18)도 transposon에 의하여 T-DNA내의 옥옥신 합성에 관여하는 유전자들에 돌연변이가 일어난 Ti plasmid를 가지고 있는 *Agrobacterium* 균주에 의해 유도된 crown gall에서 shoot가 형성되었다는 보고를 하였으므로, pTiKU12에서 식물체로 전달 삽입되는 T-DNA내에 존재하는 유전자들 중에서 옥옥신 합성에 관련되는 유전자에도 돌연변이가 일어난 것이 아닌가 추측되며, 향후 pTiKU12의 T-DNA 내부에 존재하는 유전자들의 기능 및 발현과정에 관한 보다 자세한 연구가 진행되면 명확한 규명이 이루어 질 수 있을 것으로 사료된다.

pTiAch5와 pTiKU12의 동질성 조사

Octopine type Ti plasmid인 pTiAch5를 BamHI으로 절단한 후 전체를 ^{32}P 로 표지하여 제조한 탐침을 이용하여, KU911내에 존재하는 octopine type Ti plasmid인 pTiKU12와 pTiAch5의 동질성을 조사한 결과, pTiKU12를 EcoRI으로 처리하였을 때 나타나는 절편들 중 pTiAch5와 동질성을 나타내는 절편들을 모두 합하면 약 80 kb였으며 이것은 240 kb 크기인 pTiKU12의 약 33%에 해당된다(Fig. 6, lane 3). Sciaky 등(25)은 23종류의 *Agrobacterium* 균주내

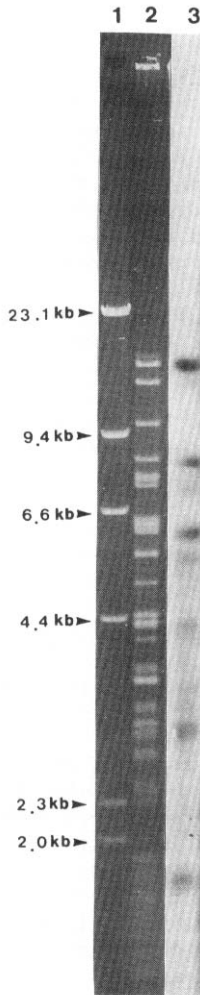


Fig. 6. Hybridization of pTiKU12 with ^{32}P -labeled total pTiAch5 DNA.

DNA fragments were transferred to nitrocellulose filter after digestion and gel electrophoresis. Electrophoresis was carried out at 5 V/cm on 0.7% TAE agarose gel for 15 hrs. Lane 1, λ DNA digested with HindIII; lane 2, EcoRI fragments of pTiKU12 in agarose gel; lane 3, the corresponding autoradiographs.

에 존재하는 Ti plasmid의 동질성을 조사한 결과, octopine type Ti plasmid들은 nopaline type Ti plasmid와는 달리 매우 높은 동질성을 가지고 있는 것으로 보고하였으며, Engler 등(12)은 pTiAch5가 nopaline type Ti plasmid인 pTiC58과 동질성을 가지는 부분을 hybridization을 이용하여 조사하였을 때 T-DNA의 일부, vir region 전체, incompatibility group 결정부위와 replication origin 그리고 trans-

fer에 관련된 유전자가 존재하는 부위가 포함된 전체의 30% 정도만이 동질성을 나타낸다고 보고하였는데, pTiKU12가 pTiAch5와 같은 octopine type Ti plasmid임에도 불구하고 오히려 nopaline type Ti plasmid인 pTiC58의 경우처럼 낮은 동질성을 나타낸 것은 지금까지 알려진 것과는 달리 octopine type Ti plasmid들도 모두가 유사한 것은 아니라는 것을 의미하는 것이다. 현재로서는 이러한 특성이 KU12가 다른 *Agrobacterium* 균주들과 비교하였을 때 나타난 차이점의 근원이 아닌가 추정되며, 보다 정확한 이유의 규명을 위하여 pTiKU12의 분자적인 특성 및 KU12에 의한 종양유발과정에 대한 연구를 진행중에 있다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 일반연구비(1991-1993)의 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

1. An, G., 1987. Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis, p. 292-305. In R. Wu and L. Grossman(ed.), Methods in enzymology vol. 153.
2. Blundy, K.S., J. White, J.L. Firmin, and A.G. Hepburn, 1986. Characterization of the T-region of the SAP-type Ti plasmid pTiAT181: Identification of a gene involved in SAP synthesis. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 62-67.
3. Braun, A.C. and H.N. Wood, 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. USA* **73**, 496-500.
4. Bytebier, B., F. Deboeck, H.D. Greve, M.V. Montagu, and J. P. Hernalsteens, 1987. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5345-5349.
5. Cha, Y.J., J.S. Eum, S.B. Hong, and W.S. Sim, 1983. Possible use of the Ti plasmid for genetic engineering of higher plants. I. Isolation of Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* in Korea. *Kor. Jour. Microbiol.* **21**, 238-244.
6. Chilton, M.D., S.K. Farrand, R.L. Levin, and E.W. Nester, 1976. RP4 promotion of transfer of a large *Agrobacterium* plasmid which confers virulence. *Genetics* **83**, 609-618.
7. Chung, S.H. and W.S. Sim, 1987. Transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber cells with *Agrobacterium tumefaciens* and Ti plasmid DNA. *Korean Biochem. J.* **20**, 389-398.
8. De Cleene, M., 1985. The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopath. Z.* **113**, 81-89.
9. Depicker, A., M.V. Montagu, and J. Shell, 1983.

- Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids. p. 143-176. In T. Kosuge (ed.), Genetic engineering of plants. Plenum Press, New York.
10. De Vos, D., M.D. Beuckeleer, M.V. Montagu, and J. Shell, 1981. Restriction endonuclease mapping of the octopine tumor inducing plasmid pTiAch5 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **6**, 249-253.
 11. Eckhardt, T.A., 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**, 584-588.
 12. Engler, G., A. Depicker, R. Maenhaut, R. Villarroel, M.V. Montagu, and J. Shell, 1981. Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Mol. Biol.* **152**, 183-208.
 13. Guyon, P., M.D. Chilton, A. Petit, and J. Tempe, 1980. Agropine in null-type crown gall tumors, evidence for generality of the opine concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2693-2697.
 14. Hernalsteens, J.P., L. Thia-Toong, J. Schell, and M.V. Montagu, 1984. An *Agrobacterium*-transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis*. *EMBO J.* **3**, 3039-3041.
 15. Jun, G.A., Y.N. Lee, and W.S. Sim, 1990. Host range of pTi12 contained *Agrobacterium tumefaciens* KU12 isolated from Korea. *Korean J. Bot.* **33**, 97-104.
 16. Kerr, A., P. Manigault, and J. Tempe, 1977. Transfer of virulence *in vivo* and *in vitro* in *Agrobacterium*. *Nature* **265**, 560-561.
 17. Kim, J.Y., S.H. Chung, and W.S. Sim, 1991. Inducers for the *vir* gene expression of Ti plasmid in Korean *Agrobacterium tumefaciens* KU12. *Korean J. Bot.* **34**, 245-251.
 18. Leemans, J., R. Deblaere, L. Willmitzer, H. De Greve, and J.P. Hernalsteens, 1982. Genetic identification of functions of T₁-DNA transcripts in octopine crown gall. *EMBO J.* **1**, 147-152.
 19. Lippincott, J.A., B.B. Lippincott, and M.P. Starr, 1981. The genus *Agrobacterium tumefaciens*, p. 842-855. In M.P. Starr, H. Stoip, H.G. Trupper, A. Balows, and H.G. Schiegl(ed.), The prokaryotes Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin.
 20. Marco, M.A., R. Chipperfield, and H.C. Birnboim, 1982. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal. Biochem.* **121**, 382-387.
 21. Montaya, A.L., M.D. Chilton, M.P. Gordon, D. Sciaky, and E.W. Nester, 1977. Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells, role of plasmid genes. *J. Bacteriol.* **129**, 101-107.
 22. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**, 473-497.
 23. Petit, A. and J. Tempe, 1985. The function of T-DNA in nature. p.625-636. In L. Vloten-Doting, G. Groot, and T. Hall(ed.), Molecular form and fuction of the plant genome. Plenum Publishing Corp., New York.
 24. Raineri, D.M., P. Bottino, M.P. Gotdon, and E.W. Nester, 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/Technology* **8**, 33-38.
 25. Sciaky, D., A.L. Montoya, and M.D. Chilton, 1978. Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Plasmid* **1**, 238-253.
 26. Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
 27. Tempe, J. and A. Petit, 1982. Opine utilization by *Agrobacterium*. p. 451-459. In G. Kahl and J. Shell(ed.), Molecular biology of plant tumors. Academic Press, New York.
 28. Thomashow, M.F., R. Nutter, A.L. Montoya, M.P. Gordon, and E.W. Nester, 1980. Integration and organization of the Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* **19**, 729-739.
 29. Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holster, S.V. deu 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. Van Larebeke, N., C. Genetello, J. Shell, R.A. Schilperoort, A.K. Hermans, J.P. Hernalsteens, and M.V. Montagu, 1975. Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic *Agrobacteria* as a result of plasmid transfer. *Nature* **255**, 742-743.
 31. Watson, B., T.C. Currier, M.P. Gordon, M.D. Chilton, and E.W. Nester, 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **123**, 255-264.
 32. Zaenen, I., N. Van Larebeke, H. Teuchy, M.V. Montagu, and J. Schell, 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* **86**, 109-127.

(Received July 5, 1993)

(Accepted July 16, 1993)

ABSTRACT: Identification of Octopine Type Ti Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* KU12

Lee, Yong-Woog, Jin Seong Eum¹, and Woong-Seop Sim* (Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, and ¹Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon 301-729, Korea)

Agrobacterium tumefaciens KU12 isolated from Korea is able to induce tumors on various plants and catabolize octopine as a sole carbon and nitrogen source. *A. tumefaciens* KU12 contains three plasmids. Their sizes are 45.5 kb, 240 kb and >240 kb, respectively. For the purpose of identification of octopine type Ti plasmid, avirulent *A. tumefaciens* A136 is transformed with plasmids isolated from KU12 by direct transformation. Transformants containing Ti plasmid were grown on AB medium containing octopine as a sole nitrogen source. The isolated strain, named KU911, contains only 240 kb plasmid. As a result of induction of crown gall and Southern hybridization with other octopine Ti plasmid pTiAch5, 240 kb plasmid named pTiKU12 was Ti plasmid.