

한국산 *Agrobacterium* plasmid의 유전학적 성상에 관한 연구*

영남대학교 의과대학 생화학교실
김정희 · 구용범 · 이기영

영남대학교 의과대학 미생물학교실
정 재 규

서 론

*Agrobacterium tumefaciens*는 토양균의 일종으로 많은 종류의 쌍자엽식물의 손상조직으로 침입하여 bacterial DNA가 숙주 식물세포의 nuclear DNA에 integrate(통합)되어 식물세포는 bacterial gene을 발현하게되며 식물의 손상조직은 neoplastic growth가 야기되어 crown gall tumor(근두암종)가 생기며 *A. tumefaciens*에 존재하는 tumor inducing (T₁) plasmid가 그 원인이 된다¹⁻³.

식물에 일단 tumor가 생기면 *Agrobacterium*없이도 암조작은 성장이 계속되며 이러한 transformed tumor cell의 특성은 보통 식물 세포 배양에 필요한 홀몬의 공급없이도 성장이 가능하다. 아울러 arginine 유도체인 opine을 합성하며 이것이 tumor를 유발한 *Agrobacterium*에 carbon 및 nitrogen 공급원이 되며 여기에 관여하는 gene 역시 T₁ plasmid에 기인된다⁴.

T₁ plasmid에는 형질전환(transformation)에 필수적인 두 region이 존재하며 하나는 transfer DNA (T-DNA)로 tumor형성을 유발하는 gene이며 다른 하나는 virulence gene(Vir-gene)으로 tumor형성에는 필수적이거나 그 유지에는 필요하지 않다^{1,5,6}. 따라서 T₁ plasmid는 T-DNA를 식물 gene에 integrate시켜 외래성 DNA를 식물세포 염색체속에 삽입할 수 있는 vector 구실을 할 수 있다^{7,8}. 또한 tumor 유발 gene을 transposon 등으로 무력화시켜 식물의 정상 성장 및 분화를 보전시킬 수 있으며⁹ nontumorigenic *A. radiobacter* strain K-84에서

bacteriocin 유도체가 합성되어 이것이 crown gall tumor의 성장을 조절하는 물질로 알려짐으로써¹⁰ T₁ plasmid는 식물에 있어 recombinant(재조합) DNA의 총아로 등장하게 되었다^{10,11}.

한편 정상 식물세포에는 존재하지 않고 crown gall tumor 조직에서만 나타나는 opine은 octopine, nopaline 및 agropine 등으로 구분되며 이들 각각을 생성할 수 있는 opine synthetase gene이 T₁ plasmid에 존재하며 각각 특유한 opine을 생성하는 균에 따라 octopine-, nopaline-, agropine- 생산균주로 구분하고¹² bacterial strain에서는 opine을 express하지 않는 것으로 알려져 있으며^{1,13,14}, 최근 succinamopine이라는 새로운 opine을 산출하는 *Agrobacterium*도 발견되었다¹⁵.

본 실험에서는 한국에서 발견된 식물의 crown gall에서 분리된 *Agrobacterium* plasmid의 유전적 특성을 밝혀 보고자 각종 crown gall 조직에서 균을 분리해내어 이들의 tumor유도와 plasmid의 정제 및 octopine을 추출해 보았다.

재료 및 방법

1. 재 료

서울 및 대구근처에서 쌍자엽식물에 속하는 사과나무(*Malus pumila* Mill), 미류나무(*Populus monilifera*), 장미(*Rosa species*) 및 은사썩나무(*Populus tomentiglandulosa*)에 발생한 crown gall tumor를 채집하여 균을 분리했으며 대조균주로 *Agrobacterium tumefaciens*(ATCC 15955)을 미국에서 구입 사용하였다.

*본 연구는 유전공학학술연구비 보조로 이루어 졌음.

시약으로는 cesium chloride, ethidium bromide, octopine, phenanthraquinone, Amberite IR 120B 등은 Sigma사 제품을 agarose, SDS는 Biorad사, trypton 및 yeast extract는 Difco사, 각종 제한효소는 BRL에서 구입하였으며 그의 일반시약은 시판 특급시약을 사용하였다.

2. 방 법

(1) 균의 분리

Tumor의 주위 조직을 말끔히 베낸후 0.1% HgCl₂로 소독한뒤 증류수로 세척하여 멸균된 유발에 넣어 곱게 분쇄후 TY액체배지(0.5% trypton, 0.3% yeast extract)에서 29°C로 log phase까지 배양한 후 다시 plate에 접종하여 자란균을 현미경 관찰로 Agrobacterium을 확인하였다.

(2) Plasmid의 screening

각 균을 1ml의 TY액체배지에서 배양하여 집균후 TE buffer(20mM Tris, 2mM EDTA, pH 8.0)로 세척하여 50 μ l의 TE buffer에 녹인후 950 μ l의 lysis buffor(TE buffer, 1% SDS, pH 12.45)를 첨가하여 34°C에서 20분 처리하여 2M Tris(pH 7.0)로 pH 8.5가 되게 맞추어서 NaCl을 최종농도 3%가 되게 가한다. Phenol-chloroform(1:1)으로 처리하여 단백질을 제거후 상층을 전기영동 시료로 사용하였다¹⁰⁾.

(3) Tumor 유도 test

해바라기, 장미, 포플라등의 줄기에 멸균된 칼로 상처를 낸후 24시간이 지난 다음 멸균 tooth pick로 분리한 균 및 대조균 Agrobacterium(ATCC 15955)를 각각 접종하였다¹⁶⁾.

(4) T₁ plasmid의 분리 및 정제

500ml의 TY액체배지에서 파장 660nm에서 흡광도 0.8-1.2되게 배양후 집균하여 20% sucrose가 든 10mM Tris-100mM NaCl(pH 8.0)로 씻은후 60ml에 녹여 0.5M EDTA(pH 8.0)를 30ml, 증류수 26ml를 첨가하여 4°C에 30분 세워둔 다음 lysis액(100mM Tris, 0.05M EDTA, 500mM NaCl, 2% SDS, pH 8.0)을 72ml 가하여 25°C에서 맑은액이 될때까지 방치한후 3M NaOH로 pH 12.1이 되게 맞춘다. 다시 2M Tris(pH 5.0)로 pH 8로 조절하여 NaCl이 1M되게 가한후 4°C에서 4-24시간 방치한다. 원침하여 chromosomal DNA 및 membrane 등을 제거후 polyethylene glycol(6,000)을 10%되게 가하여 다시 4°C에 하룻밤 세워 둔다음 원침하여 침전물을 8ml의 TE buffer(pH 8.0)에 녹여 plasmid를 분리하였다¹⁷⁾.

분리한 시료에 8g의 cesium chloride와 0.64ml의 ethidium bromide(EtBr) (5mg/ml)을 초원심분리 vial에 넣은후 Sorvall Ultracentrifuge(ODS 75B, rotor 867)로 40,000 rpm으로 48시간 초원심 하였다. 분리된 T₁ plasmid는 saturated butanol로 EtBr을 제거후 TE buffer에 투석하여 정제하였다¹⁸⁾.

(5) 제한효소처리

분리한 T₁ plasmid(pT₁) 2 μ g/10 μ l에 각 제한효소 EcoRI, Hind III, BamHI 및 Hpa I을 5-10 unit 되게 가하고 각각 해당 buffer(BRL처방)을 가한후 37°C에서 3시간 처리하여 전기영동 시료로 사용하였다¹⁹⁾.

(6) Agarose gel 전기영동

9 μ l의 각 시료에 sample loading buffer (0.5% bromophenol blue, 50% glycerol)을 각각 1 μ l 가하여 well에 적용하며 전기영동액은 TBE (0.089M Tris, 0.089M boric acid, 0.002M EDTA)를 사용하여 screening시는 20 volt/cm로, T₁ plasmid 적용시는 7 volt/cm로 2시간 영동 하였다^{19,20)}.

(7) Octopine 추출 및 확인

crown gall조직 25g을 80% ethanol 2배량에 homogenize한후 15,000 rpm에 20분 원침하여 상층액을 Dowex 50w column(6 \times 2.6cm)에 넣은다음 80% ethanol 및 증류수로 차례로 씻은 다음 2N NH₄OH로 용출하여 암모니아수를 날려 보내고 Amberite IR-120B column (8 \times 2.6cm)에 다시 흡착시킨 후 1N pyridine으로 octopine을 용출하여 용매를 진공펌프로 날려보내고 남은 octopine을 thin layer chromatography(TLC)로 분리하였다. TLC solvent로는 butanol : pyridine : water (1 : 1 : 1)를 사용하였고 발색시약은 acetic acid에 녹인 phenanthraquinone을 분무하여 UV transilluminator 상에서 확인하였다²¹⁾.

성 적

(1) 분리한 Agrobacterium균종

각 crown gall 조직에서 분리해낸 Agrobacterium은 사과나무에서 3종(A₁-A₃), 미류나무에서 6종(W₁-W₆), 은사썩나무에서 3종(P₁-P₃), 장미에서 1종(R₁)으로 도합 13종을 분리하여 Korean type strain으로 분류하였다(Table 1).

(2) Agrobacterium의 plasmid screening

분리한 Agrobacterium strain중 W₂, W₃, W₆, P₁, P₃ 및 A₂ 균주에서 plasmid가 관찰 되었고 ATCC 15955(120 Mdalton)의 plasmid보다 P₁ 및 A₂

Table 1. Agrobacterium isolated from Korean crown gall

Sources	Strains
Malus pumila Mill	A ₁ A ₂ A ₃
Populus monilifera	W ₁ W ₂ W ₃ W ₄ W ₅ W ₆
Populus tomentiglandulosa	P ₁ P ₂ P ₃
Rosa species	R ₁

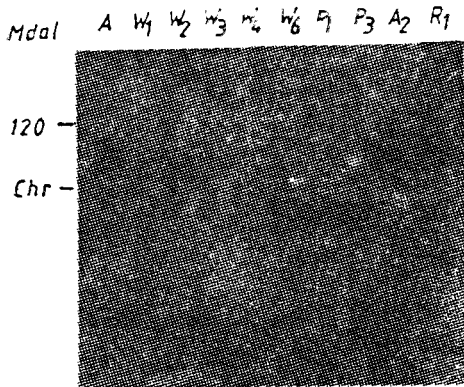


Fig. 1. Screening of Plasmids from Agrobacterium species. A; ATCC 15955 (120Mdal), W₁₋₆, P₁₋₃, A₂ and R₁; Korean type strains, chr; linear fragment of chromosomal DNA.



Fig. 2. Tumor induction from sun flower stem inoculated with strains ATCC 15955 (A) and KW₂ (B). A; 4weeks, B; 6 weeks after inoculation.

의 plasmid가 더 크며 나머지 plasmid는 크기가 작았다(Fig. 1.).

(3) Tumor 유도시험

각 균들의 virulence test 결과 해바라기에 접종한 ATCC 15955와 Korean type W₂ strain(KW₂)에서

만 crown gall tumor가 발생함을 관찰 하였다(Fig. 2).

(4) T_i plasmid의 정제

초원심분리로 정제한 T_i plasmid는 상층에 chromosomal band와 하층에 T_i plasmid band가 분리 되었으며(Fig. 3.), plasmid만 뽑아 전기영동 양상을 관찰 하였던바 각각 single band의 T_i plasmid를 확인 하였다(Fig. 4.).

(5) T_i plasmid의 restriction fragment pattern

ATCC 15955와 KW₂ strain의 T_i plasmid에 제한 효소처리로 EcoRI으로 25개 및 27개, Hind III로 23개와 21개, BamHI으로 각각 20개 및 Hpa I으로 12개와 27개의 band를 관찰 하였으며(Fig. 5.) 각 band의 크기를 Southern의 공식²²⁾에 적용하여 계산한 결과 T_i plasmid의 크기는 ATCC 15955가 약 200 kbases(kb) 정도이며 KW₂가 약 87kb로 측정되었다.

(6) Octopine의 thin layer chromatography 양상

Tumor 조직에서 추출한 octopine은 TLC로 분석한 결과 Rf치가 진성 octopine(Sigma Co, USA)이 0.9였고 ATCC 15955 tumor에서 나온 octopine이

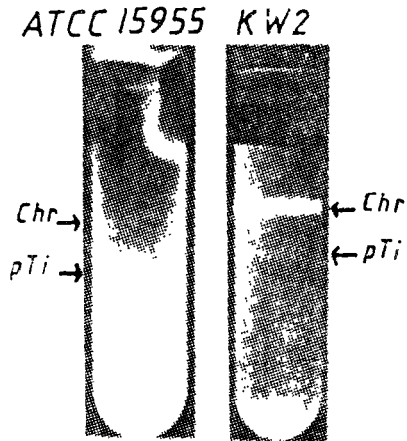


Fig. 3. Separation of Ti plasmid and chromosomal DNA of Agrobacterium tumefaciens by CsCl-EtBr density gradient centrifugation. chr: Chromosomal DNA, pT_i: T_i plasmid, (KW₂): Korean type W₂ strain.

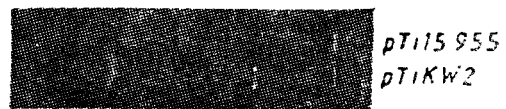


Fig. 4. Agarose gel (0.7%) electrophoresis of purified Ti plasmid by CsCl-EtBr density gradient ultracentrifugation.

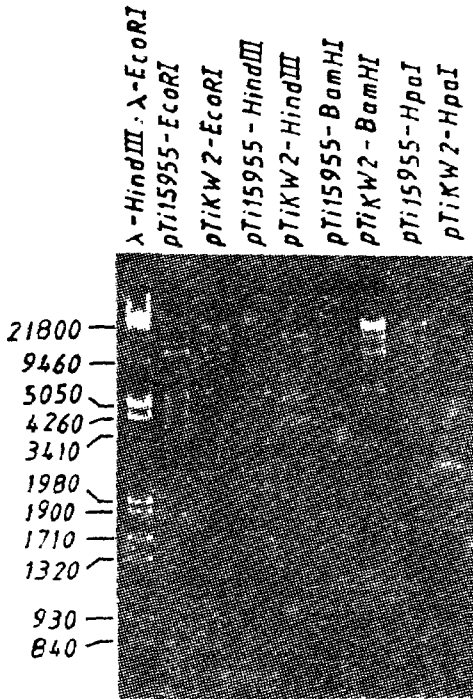


Fig. 5. Agarose gel (0.7%) electrophoresis pattern of restriction fragments of Ti plasmid. For size comparison, the Hind III digested fragments of lambda DNA were shown in left lane.

0.85이며 W₁-W₆, P₁-P₃ tumor에서 나온 octopine의 Rf치가 0.85-0.92로 나왔으므로 이들 각 균은 octopine type의 균주로 사료 되었다(Fig. 6.).

고 찰

토양균의 일종인 Agrobacterium tumefaciens에

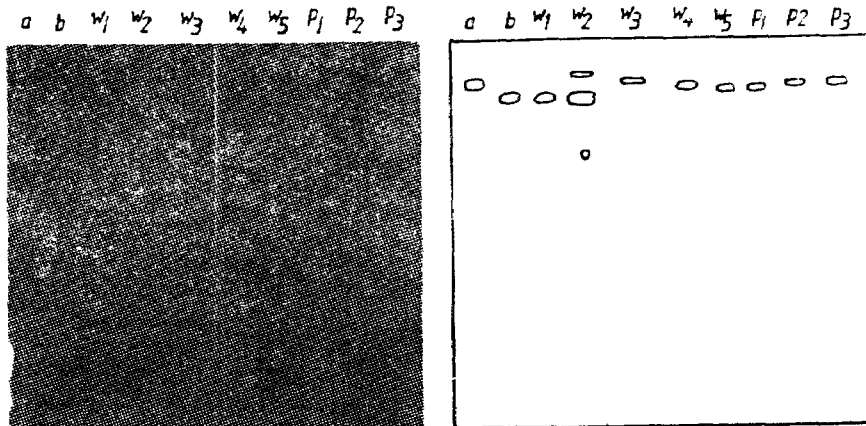


Fig. 6. Thin layer chromatography and schematic representation (right side diagram) for detection of octopine from crown gall. a: octopine reference, b: ATCC 15955.

존재하는 T₁ plasmid는 식물체에 crown gall tumor를 일으키는 gene으로 식물 양액체에 새로운 외래성 gene을 도입시킬 수 있는 잠재력이 있다고 알려졌고¹⁾, 현재 T₁ plasmid를 가진 여러종류의 Agrobacterium들이 밝혀져 있으며^{2,19,23,24)}, 또 다른형인 Agrobacterium rhizogenes에 존재하는 plasmid는 식물체의 뿌리에 hairy root disease라는 뿌리암이 생기며 이러한 plasmid를 R₁ (root inducing) plasmid라 한다^{7,19)}.

T₁ plasmid(pT₁)의 크기는 대개 140-235 kbases (kb)정도로 이중 ATCC 15955 plasmid는 200kb (120 Mdal)로 추산된다¹⁾.

본 실험에서는 crown gall을 사과나무, 미류나무, 은사귀나무 및 장미나무에서 각각 발견하였으며 이 한균산 crown gall에서 Agrobacterium균주를 분리하여 이들 plasmid를 관찰해 본 결과 ATCC 15955에 비해 P₁과 A₂ plasmid가 컸고, W₂, W₃, W₆ 및 P₃는 작았으며 W₆에선 아주 작은 크기의 plasmid도 동시에 관찰되었다. 아울러 이들 균을 몇종의 상차엽식물(허바라기, 포플라, 장미)에 접종 하였으나 단지 ATCC 15955와 Korean type W₂(KW₂) strain만이 tumcr를 유발시킨 것으로 보아 이들 plasmid는 T₁ plasmid로 확신된다. 그러나 plasmid가 발견된 나머지 균들도 tum.or조직에서 분리된 Agrobacterium plasmid이며 동시에 작균들의 plant specificity등이 고려 되므로 역시 T₁ plasmid로 간주된다.

T₁ plasmid는 지금까지 알려진 plasmid중 가장 큰 plasmid들로 그 추출과정이 어려워 추출 방법에 있어서도 여러학자들에 의해 새로운 방법들이 제기되었다. Zaenen등²⁵⁾은 alkaline sucrose (5-20%) gradient에 의한 초원심분리법을 소개하였고 Agro-

bacterium이 alkali에 약한것을 이용하여 Casse등¹⁰⁾과 Kado등²⁶⁾은 pH를 12.4-12.6으로 올려 세포막을 파괴 시켰으며 Ooms등¹⁷⁾은 alkali lysis 후 polyethylene glycol(PEG 6,000) 침전법을 이용한 plasmid 분리법을 개발하였다.

본 실험에서도 위에 열거한 방법들을 모두 이용하여 추출해 보았고 그 중 screening을 위해서는 Casse등¹⁰⁾의 방법을, 경계를 위해서는 tumor 유도 조직에서 분리된 ATCC 15955와 KW₂균을 다시 분리하여 대량의 균을 Ooms등¹⁷⁾의 PEG 침전법으로 추출후 cesium chloride-ethidium bromide density gradient 초원심분리로 경계 하였다¹⁸⁾.

최근 T₁ plasmid (pT₁)를 유전자조작에 이용하고자 하는 연구들이 많이 진행되었으며²⁶⁻²⁸⁾ 그 plasmid들의 크기 및 restriction map등이 알려지게 되었고²⁾ Drummand등²⁸⁾은 pT₁, B₆806은 크기가 122 Mdal으로 제한효소 Sma I으로 18개, Hpa I으로 16개의 fragments를 관찰 하였으며 Thomashow등²⁴⁾도 여러 *Agrobacterium*균종의 plasmid를 제한효소 처리한 것중 pT₁, B₆806과 pT₁, T37에서 Sma I 처리로 14개 및 16개의 fragments를, BamHI으로 19개 및 10개의 fragments를 확인 하였으며 pTi B₆806과 pTi T37의 homology를 15%로 보고하였다. White등¹⁹⁾도 pT₁, B₆806과 pTi T37등 4종의 Ti plasmid에 대하여 opine과 restriction fragments를 관찰 하였으며 아울러 몇종의 plasmid의 T-DNA 부위와 restriction map등이 보고^{16,17,19)}되었다.

본 실험에서도 제한효소 EcoRI, BamHI, Hind III 및 Hpa I으로 pT₁, ATCC 15955와 pT₁, KW₂의 fragment pattern을 관찰한 결과 두 plasmid의 크기와 restriction pattern이 크게 달랐으며 pT₁, ATCC 15955가 200kb인데 비해 pT₁, KW₂가 87kb정도로서 pT₁, ATCC 15955보다 pT₁, KW₂의 크기가 적어 vector로서의 이용도가 더 높은 것으로 기대된다.

Crown gall tumor를 control하는 물질로 agrocin 유도체가 *A. radiobacter* K-84에서 생성되는 것이 알려지고 이 plasmid(pAgk 84)에 agrocin 생산 gene이 함유되어 있다¹¹⁾. 아울러 알려진 각 균들을 생산하는 opine 종류에 따라 분류할때¹²⁾ octopine 생산균주로 ATCC 15955¹¹⁾와 B₆ 806^{4,19,23,24)} 및 A₆²⁴⁾등이 있으며 nopaline 생산균주로 C58^{11,29,30)}등이, agropine 생산균주로 A₆, A₆₆ 및 B₆등이 알려졌고¹³⁾ 최근 succinamopine이라는 새로운 opine이 알려졌으며 여기에 속하는 균으로 AT181, EU6 및 T10/73등³¹⁾을 대표로 들 수 있다.

본 실험에서는 tumor 조직으로 opine생산형을 알기위해 우선 octopine을 추출하여 thin layer chromatography법으로 확인한 결과 진성 octopine(Sigma Co., USA)과 octopine type균인 ATCC 15955의 Rf치가 비슷 하였고 Korean type균인 W₁-W₆와 P₁-P₃ 역시 Rf치가 비슷하게 관찰 되었으므로 이 균들은 octopine 생산균주로 사료되었다.

이외에도 많은 *Agrobacterium* plasmid들이 알려져 있고 T₁ plasmid내 transposon(T_n)등을 이용하여 tumor induction부분만 제거하여 다른 세포에 도입하는 외래성 vector로서 이용할 뿐 아니라^{10,23,24)} mutant를 일으켜 식물암기전을 밝힐수 있을 것^{6,31)}으로 기대된다.

요 약

한국산 *Agrobacterium tumefaciens*의 분리 및 tumor inducing (T₁) plasmid의 유전적 특성을 비교 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

*Agrobacterium*균은 사과나무(A₁-A₃), 미류나무(W₁~W₆), 은사피나무(P₁-P₃) 및 장미(R₁)의 crown gall tumor에서 도합 13종을 분리 하였으며 각 균의 plasmid를 관찰한 결과 ATCC 15955보다 P₁ 및 A₂가 크기가 컸으며 W₂, W₃, W₆ 및 P₃는 작았으며 각균의 tumor 유도는 해바라기에 ATCC 15955와 Korean type W₂ (KW₂)을 접종한 것에서 단 각각 점종 4주 및 6주만에 crown gall을 관찰하였다. 아울러 두 균종의 T₁ plasmid(pT₁)를 정제하여 몇종의 제한효소를 처리 하였으며 pT₁, ATCC 15955와 pT₁, KW₂는 EcoRI 처리로 25개 및 27개의 band를, Hind III로 23개와 21개, BamHI으로 각각 20개 및 Hpa I으로 12개 및 27개의 band를 관찰하였으며 크기는 pT₁, ATCC 15955가 200 kbases (kb)로 pT₁, KW₂가 87 kb로 관찰 되었다. 아울러 octopine은 W₁-W₆ 및 P₁-P₃균에 의한 tumor조직에서 관찰 되었고 이들균을 octopine type균으로 사료 되었다.

참 고 문 헌

1. Ream, L.W., and Gordon, M.P.: Crown gall disease and prospects for genetic manipulation of plants. *Science*, 218 : 854-859, 1982.

2. Koekman, B.P., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A.: A functional map of the replicator region of the octopine Ti plasmid. *Plasmid*, 7: 119-124, 1982.
3. Farrand, S.K., Kado, C.I., and Lreland, C.R.: Suppression of tumorigenicity by the Inc WR plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genetics*, 181: 44-51, 1980.
4. Chilton, M.D.: A vector for introducing new genes into plants. *Scientific Amer.*, Jun:36-46, 1983.
5. Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P. J.J., and Schilperoort, R.A.: A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303: 179-180, 1983.
6. Nester, E.W., Garfinkel, D.J., Gelvin, S. B., Montoya, A.L., and Gordon, M.P.: *Molecular Biology, pathogenicity and Ecology of Bacterial plasmids*. Ed. by Levy, S.B., Clowes, R.C., and Koenig, E.L. Plenum Press, N.Y. and London, 1981, pp.467-476.
7. Hooykaas, P.J.J., Dulk-Pas, H.D., and Schilperoort, R.A.: Method for the transfer of large cryptic, non-self-transmissible plasmids; Ex planta transfer of the virulence plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid*, 8:94-96, 1982.
8. Yang, F., and Simpson, R.B.: Revertant seedling from crown gall tumors retaining a portion of the bacterial Ti-plasmid DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 4151-4155, 1981.
9. Klapwijk, P.M., Breukelen, J.V., Korevaar, K., Ooms, G., and Schilperoort, R.A.: Transposition of Tn 904 encoding streptomycin resistance into the octopine Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 141: 129-136, 1980.
10. Casse, F., Boucher, C., Julliot, J.S., Michel, M., and Dearie, J.: Identification and characterization of large plasmid. *J. Gen. Microbiol.*, 229, 1979.
11. Slota, J.E., and Farrand, S.K.: Genetic isolation and physical characterization of pAgK84, the plasmid responsible for Agrocin 84 production. *Plasmid*, 8: 175-186, 1982.
12. Hooykaas, P.J.J., Dulk-pas, H.D., Ooms, G., and Schilperoort, R.A.: Interactions between octopine and nopaline plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 143: 1295-1306, 1980.
13. Firmin, J.L., and Fenwick, G.R.: Agropine -a major new plasmid determined metabolite in crown gall tumors. *Nature*, 276: 842-844, 1978.
14. Guyon, P., Chilton, M.D., Petit, A., and Tempe, J.: Agropine in "Null-type" crown gall tumors; Evidence for generality of the opine concept. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 2693-2698, 1980.
15. Chilton, W.S., Tempe, J., Matzke, M., and Chilton, M.D.: Succinamopine; a new crown gall opine. *J. Bacteriol.*, 157: 357-362, 1984.
16. Hille, J., Klasen, I., and Schilperoort, R.: Construction and Application of R prime plasmids carrying different segments of an octopine Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*, for complementation of vir genes. *Plasmid*, 7: 107-118, 1982.
17. Ooms, G., Klapwijk, P.M., Foalis, J.A., and Schilpert, R.A.: Characterization of Tn 904 insertions in octopine Ti-plasmid mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 144: 82-91, 1980.
18. Currier, T.C., and Nester, E.W.: Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.*, 76: 431-441, 1976.
19. White, F.F., and Nester, E.W.: Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. *J. Bacteriol.*, 144: 710-719, 1980.
20. Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P., and Falkow, S.: Simple agarose gel electrophoretic method for identification and characterization of plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, 127: 1529-1537, 1976.
21. Hasezawa, S., Nagata, T., and Syono, K.: Transformation of vinca protoplasts mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Mol. Gen.*

- Genetics., 182: 206, 1981.
22. Southern, E.: In "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Ray Wu, ed). Academic Press, New York., 1979, pp.152-163.
 23. Garfinkel, D.J., and Nester, E.W.: *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J. Bacteriol.*, 144: 732-743, 1980.
 24. Thomashow, M.F., Knauf, V.C., and Nester, E.W.: Relationship between the limited and wide host range octopine-type Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 146: 484-493, 1981.
 25. Zaenen, I., Larebeke, N.V., Teuchy, H., Montagu, M.V., and Schell, J.: Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.*, 86:109-127, 1974.
 26. Kado, C.I., and Liu, S.T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1373, 1981.
 27. Klee, H.J., Gordon, M.P., and Nester, E. W.: Complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid mutations affecting oncogenicity. *J. Bacteriol.*, 150: 327-335, 1982.
 28. Drummond, M.H., and Chilton, M.D.: Tumor inducing plasmids of *Agrobacterium* share extensive regions of DNA homology. *J. Bacteriol.*, 136:1178-1183, 1978.
 29. Schardl, C.L., and Kado, C.I.: Ti plasmid and chromosomal ornithine catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *C58. J. Bacteriol.*, 55: 196-202, 1983.
 30. Watson, B., and Currier, T.C: Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 123: 255-264, 1975.
 31. Drummond, M.H., Gordon, M.P., Nester, E.W., and Chilton, M.D.: Foreign DNA of bacterial plasmid origin is transcribed in crown gall tumors. *Nature*, 269: 535-536, 1977.

—Abstract—

Comparative Genetic Characterization of Plasmids of *Agrobacterium* Species Isolated in Korea

Jung Hye Kim, Yong Bum Koo, and Ki Yung Lee

*Department of Biochemistry
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

Jae Kyu Chung

Department of Microbiology
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea

The soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens* is a plant pathogen that causes crown gall tumors by infecting the wounded dicotyledonous plants and subsequent integration of bacterial DNA into plant nuclear DNA. Virulent *A. tumefaciens* strains harbor a large Ti (tumor-inducing) plasmid that carries genes essential for tumorigenesis.

In the present study, 13 strains (*Malus pumila* Mill; A₁₋₃, *Populus monilifera*; W₁₋₆, *Populus tomentiglandosa*; P₁₋₃ and *Rosa* species; R₁) of *Agrobacterium* isolated in Korean crown gall tumors and plasmids were observed in 6 strains (W₂, W₃, W₆, P₁, P₃ and A₂).

The test for crown gall tumor formation was resulted only in ATCC15955 and KW₂ strains inoculated into the stem of sun flower and the development was observed for 4 and 6 weeks after inoculation. Above two Ti plasmids (pTi) were purified by cesium chloride-ethidium bromide density gradient centrifugation and digested with restriction enzyme and fragments of pTiATCC 15955 and pTiKW₂ observed by EcoR I; 25&27, Hind III; 23&21, BamH I; each 20 and Hpa I; 12&27, and sizes of pTiATCC15955 and pTiKW₂ calculated as 200 and 87 kbases.

Octopine was isolated from tumor tissue (W₁₋₆ and P₁₋₃) and these strains confirmed as octopine type.