

한국산 *Agrobacterium tumefaciens* KU12내 Ti-plasmid의 *vir* 유전자 발현 유도 물질

金俊泳·鄭相浩*·沈雄燮
(高麗大學校 生物學科, *牧園大學校 微生物學科)

Inducers for the *vir* Gene Expression of Ti-Plasmid in Korean *Agrobacterium tumefaciens* KU12

Kim, Joon Young, Sang Ho Chung* and Woong Seop Sim

(Department of Biology, Korea University, Seoul and

*Department of Microbiology, Mokwon University, Taegyeon)

ABSTRACT

In order to investigate the phenolic compounds inducing the expression of Ti-plasmid *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* KU12, we tested whether the eighteen phenolic compounds known as *vir* gene inducer have the ability to induce *vir* operon of the Ti-plasmid in *A. tumefaciens* KU12 transformed with pSM358cd. Also, the phenolic compounds in some tumor-uninduced dicotyledons and the attachment ability of *A. tumefaciens* KU12 on such dicotyledonous plants were investigated in an effort to analyze the reason why no tumor is formed on the plants. As results, fifteen among eighteen phenolic compounds known as *vir* gene inducer induced the expression of the Ti-plasmid *vir* genes. Some dicotyledonous plants which do not form the tumor have the phenolic compounds inducing the *vir* genes, but have less ability of attachment than the dicotyledonous plants forming tumor.

서 론

*Agrobacterium tumefaciens*는 그람음성 토양세균으로서 많은 쌍자엽 식물체에 crown gall tumor를 유발시키는 Ti-plasmid를 가지고 있는 병원균이다(Bevan and Chilton, 1982).

Crown gall tumor 형성은 몇 가지 연속적인 기작의 결과이다. 즉, *A. tumefaciens*에 존재하는 Ti-plasmid의 T-DNA가 식물 염색체로 삽입된 후 T-DNA에 존재하는 식물 호르몬 유전자가 발현되어 비정상적인 성장을 일으키는 것이다.

T-DNA 전이과정은 T-DNA내의 양끝에 존재하는 25 bp 정도의 border region, Ti-plasmid내에 존재하는 *vir* region (Hille *et al.*, 1984; Stachel and Nester, 1986), chromosome에 존재하는 chromosomal virulence region(*chvA*, *chvB*)의 상호작용에 의하여 일어난다(Douglas *et al.*, 1982,

1985). *chv* region은 polysaccharide인 1,2-β-D-glucan을 합성하여(Dell *et al.*, 1983), *A. tumefaciens*가 식물체에 부착하는 tumorigenesis 초기과정에 관련되어 있다. 반면, *vir* region은 6개로 구성되어져 있으며(*A, B, C, D, E, G*), *virA* gene을 제외하고는 모두 상처난 식물체에서 분비되어지는 acetosyringone과 같은 유도물질인 phenol 화합물에 의하여 유도, 발현되어 있다. 즉, *virA* gene의 산물이 bacterial membrane에 위치하여 phenol 화합물을 감지한 후 *virG* gene을 활성화시켜 다른 *vir* gene의 발현을 유도시킨다(Leroux *et al.*, 1987).

virD gene의 산물은 endonuclease로써 T-DNA border repeat를 절단하여 single-stranded DNA를 형성하게 하며(Yanofsky *et al.*, 1986), *virE* gene의 산물은 single-stranded T-DNA에 결합하는 protein을 합성하여 protein-DNA complex를 형성하게 하고(Christie *et al.*, 1988), *virB* gene의 산물은 T-DNA가 bacterial membrane을 통과하게

해주며(Engstrom *et al.*, 1987), *virC* gene의 산물은 *virD* gene 산물의 활성을 증가시켜 준다고 보고되어졌다(Zambryski *et al.*, 1989).

이상과 같은 *vir* genes의 발현을 유도시켜 주는 물질인 phenol 화합물은 식물체에 널리 분포하고 있으며, 주로 aromatic ring 구조에 hydroxyl, carboxyl, methoxyl group이 치환되어져 있다. 식물체에서 phenol 화합물은 향기, 맛, 색 등을 나타내게 해주고, 곰팡이나 세균의 침입으로부터 보호작용을 하게 해 줄 뿐만 아니라, 성장이나 분화에 대한 억제제로도 작용한다(Noggle and Fritz, 1983).

본 논문에서는 한국산 *A. tumefaciens* KU12(Ti-plasmid) 내에 있는 *vir* gene의 발현을 유도시켜주는 phenol 화합물의 종류를 조사했으며, tumor를 형성하는 쌍자엽 식물체와 형성하지 못하는 쌍자엽 식물체내에 존재하는 phenol 화합물의 종류를 비교, 분석하고 KU12에 대한 부착실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험 재료. 본 실험에서 사용한 균주는 Ti-plasmid를 함유한 *Agrobacterium tumefaciens* KU12, Ti-plasmid와 pSM358cd를 함유한 KU12, ME42(*chv* A-mutant)이며, MG/L 또는 AB배지(Chilton *et al.*, 1974)에서 28°C를 유지하며 배양하였다. 사용한 식물의 종자는 중앙종묘상사와 홍능종묘상사에서 구입했으며, *Kalanchoe daigremontiana*와 *Nicotiana tabacum* (L. Var. NC2326)는 각각 Nester 실험실과 KIST에서 분양받아 Vermiculite와 peat moss를 5:1로 섞은 토양(Bonner and Galston, 1959)에 파종하여 향운실(온도 30°C±5°C, 광주기: 16시간)에서 배양시켰다.

형질전환. *A. tumefaciens* KU12를 pSM358cd(pVK102+*virE*::Tn3-HOHD1)로 direct transformation 시켰다. 즉, KU12를 MG/L 액체배지에서 28°C를 유지하여 전배양한 후, 50 ml MG/L 액체 배지에서 OD₆₀₀=0.5가 될 때까지 배양하였다. 5000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후, 0.15 M NaCl 10 ml로 현탁하고 다시 동일한 방법으로 원심분리하여 20 mM CaCl₂ 1 ml로 재현탁하였다. Eppendorf tube에 0.2 ml 세균과 1 µg DNA(pSM358cd)를 넣고 얼음에 채워 30분간 방치 후, 액체질소에 1분 동안 급속 냉각시킨 다음 37°C 수조에서 5분 동안 녹여 28°C에서 2-4시간 동안 배양하였다. 이 후, 5000 rpm에서 2분 동안 원심분리하여 상층액을 버리고 0.1 ml MG/L 액체배지로 재현탁하여 MG/L agar 배지에 spreading하였다.

Phenol 화합물에 의한 Ti-plasmid *vir* genes의 발현. KU12와 pSM358cd/KU12를 각각 AB 액체배지에 적당한 향생체를 넣고 8시간 배양하여 bacterial cell을 수확하였다.

이것을 각각 100 µM의 phenol 화합물(Sigma와 Aldrich에서 구입)이 들어 있는 유도배지(AB salt 50 ml, AB buffer 1 ml, glucose 5 g, 0.4 M MES pH 5.45, 50 ml/l)에서 OD₆₀₀=0.1이 되도록 첨가하여 16시간 정도 유도시켰다. β-galactosidase 활성은 Miller의 방법(Miller, 1972)을 사용하여 측정하였다. 유도시킨 세균의 농도를 OD₆₀₀에서 측정하고, 세균과 Z buffer(MgSO₄·7H₂O 0.246 g, KCl 0.75 g, NaH₂PO₄·2H₂O 6.24 g, Na₂HPO₄·12H₂O 21.488 g/l에 β-mercaptoethanol을 0.05 M이 되도록 첨가)를 각각 0.5 ml씩 섞은 다음 CHCl₃ 40 µl와 0.1% SDS 20 µl를 넣고 심하게 흔들어서 주었다. 이 후 28°C에서 5분 동안 배양한 후 0.2 ml o-nitrophenyl-β-D-galactoside(ONPG: 4 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0)를 넣고 노란색 강도에 따라 최대 2시간까지 28°C에서 반응시킨 후 1 M Na₂CO₃ 0.5 ml를 첨가하여 반응을 중지시켜 기질인 ONPG가 β-galactosidase에 의해서 분해되어져 형성된 o-nitrophenol의 양을 OD₄₂₀에서 측정하였다. β-galactosidase의 활성은 다음과 같은 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{units} = \frac{\text{OD}_{420}}{t \times \text{OD}_{600}} \times 1000 \quad t = \text{반응시간(분)}$$

쌍자엽 식물체내에 존재하는 phenol 화합물 분석.

지금까지 *vir* gene 유도물질이라 알려진 phenol 화합물을 다음과 같은 방법에 따라 분리하였다(Muchitch and Fletcher, 1984). 즉, 지면으로부터 약 10-15 cm 자란 식물체를 수확하여 잘 말린 다음 70% acetone을 식물체 1g당 2 ml씩을 넣고 막자사발에서 마쇄하였다. 20,000 g에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 취하여 진공상태에서 건조시킨 후, methanol을 첨가하여 녹인 다음, petroleum ether를 3회 처리하여 지질과 비극성물질 등을 제거하였다. 이를 0.45 µm 여과막으로 거른 뒤 Sigma와 Aldrich에서 구입하여 methanol에 녹인 phenol 화합물을 표준 물질로 하여 high performance liquid chromatography와 gas chromatography를 사용하여 peak를 비교, 분석하였다.

Attachment 실험. 건강한 쌍자엽 식물체의 어린 잎을 95% ethanol로 멸균시킨 뒤, 멸균한 3차 증류수로 3회 세척하였다. 이 후, 멸균된 cork borer로 잎 원반을 만들어 MS 배지(Stachel *et al.*, 1985b) 3 ml로 보관하였고, 세균의 배양은 다음과 같이 하였다. 부착능이 상실된 균주 ME42와 KU12를 MG/L 액체배지에서 28°C를 유지하며 8시간 배양한 후, 이를 각각 10 µl씩 취하여 5 µCi ¹⁴C-phenylalanin이 함유된 0.3 ml AB 액체배지에서 8시간 배양하였다. 이 후, 10 µCi ¹⁴C-phenylalanin이 함유된 0.6 ml AB 액체 배지를 첨가하여 2-3시간 키운 후(OD₆₀₀=0.1-0.5) 1 ml AB 액체 배지로 두번 세척하여 잎 원반이 들어 있는 MS 액체배지에 3×10⁵ cpm이 되도록 넣었다.

Table 1. The *vir* gene inducing ability of the phenolic compounds

Phenolic compound	β -galactosidase activity units	<i>vir</i> -inducer
p-nitrophenol	196	+++
ferulic acid	60	+++
p-coumaric acid	54	+++
catechol	51	+++
pyrogallol	41	++
vanillin	39	++
acetosyringone	37	++
benzoic acid	34	++
resorcinol	33	++
salicylic acid	23	+
β -resorcylic acid	15	+
gallic acid	14	+
vanillic acid	13	+
caffeic acid	11	+
syringaldehyde	6	+
β -phenylpyruvic acid	-8	-
benzoquinone	-26	-
syringic acid	-29	-

The "+" mark in this table means the strength of the expression of the *vir* gene, while the "-" mark means the negative expression.

14 C-phenylalanin이 결합한 세균을 잎 원반과 1시간 30분 정도 혼합배양한 후, 잎원반을 새로운 MS 액체배지로 부드럽게 흔들어 세척하였다. 이어서, Whatman 3 MM paper를 깔고 그 위에 nitrocellulose filter를 놓아 80°C에서 30분 정도 말린 후, Kodak XAR film을 덮어서 15일간 노출시켰다(Paepcke and Hawes, 1985).

결 과

***vir* 유전자 발현유도.** Phenol 화합물에 의한 한국산 *A. tumefaciens* KU12의 *vir* 유전자 발현 정도를 조사하기 위해 reporter gene인 β -galactosidase 유전자를 사용하였다. 즉, Tn3-HoHo1(Stachel *et al.*, 1985a)이 포함된 pSM 358cd를 KU12로 direct transformation시켜 4개의 colony를 획득하였으며, 형질전환체인 pSM358cd/KU12를 사용하여 18종의 phenol 화합물에 의한 Ti-plasmid *vir* gene 발현유도 여부를 조사하였다(Table 1). Phenol 화합물이 Ti-plasmid내 *virA* 산물에 의해서 감지되면 *virG* 유전자를 활성화시킨다.

이 활성화된 *virG* 유전자의 산물이 Ti-plasmid내 다른 *vir* gene을 발현시키고, 또한 trans-acting 작용으로 pSM

358cd에 존재하는 *virE*를 발현시켜 *lacZ*로부터 β -galactosidase가 합성되어진다. 이때 β -galactosidase에 대한 기질로써 ONPG를 넣어주어 ONPG가 분해되어지는 정도를 측정함으로써 β -galactosidase의 활성을 분석하였다. 그 결과, β -phenylpyruvic acid, benzoquinone, syringic acid를 제외한 15종의 phenol 화합물이 *vir* gene 유도물질로 작용하였으며, 이들은 다음과 같이 3개의 범주로 나누어졌다. 즉, 강한 유도물질인 p-nitrophenol, ferulic acid, p-coumaric acid, catechol 등과 약한 유도물질인 β -resorcylic acid, gallic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringaldehyde 등 및 그 중간 정도의 발현을 나타낸 pyrogallol, vanillin, acetosyringone, benzoic acid, resorcinol, salicylic acid 등이다.

Phenol 화합물 분석. *A. tumefaciens* KU12가 어떤 쌍자엽 식물체에 tumor를 형성하지 못하는 이유가 *vir* gene 유도물질의 존재 여부에 의한 것인가를 알아보기 위하여 tumor를 형성한 쌍자엽 식물체인 담배, 토마토, 감자와 형성하지 못한 쑥, 채송화, 가지에 존재하는 phenol 화합물을 추출한 후 HPLC, GC를 사용하여 앞의 *vir* gene 발현 유도 실험에 사용된 phenol 화합물과 비교 분석하였다. 그 결과, tumor를 형성하지 못한 쌍자엽 식물체일지라도 *vir* gene 유도물질로 작용한 phenol 화합물이 존재함을 알았다(Fig. 1 및 Table 2). 즉, 쑥에는 vanillin이 존재하였으며, 채송화에는 resorcinol이, 그리고 가지에는 gallic acid와 syringic acid가 각각 존재하였다. 이 중 syringic acid를 제외하고는 모두 KU12의 *vir* gene 유도물질로 작용한 phenol 화합물들이다.

Attachment 실험. Tumor 형성 초기과정으로서 *A. tumefaciens* KU12가 쌍자엽식물체에 부착되는 정도를 알아보기 위하여 14 C-phenylalanin으로 표지된 세균을 잎원반과 혼합배양한 후 자가방사법을 실시하였다.

KU12는 tumor를 형성한 담배에는 강한 부착을 나타냈으나, tumor를 형성하지 못한 가지, 실비아 등에서는 비교적 약한 부착을 나타냈다(Fig. 2).

고 찰

한국산 *A. tumefaciens* KU12의 Ti-plasmid를 고등식물체의 형질 전환에 이용할 수 있는 plant binary vector system을 개발하는데 필요한 기초자료를 제공하기 위하여 KU12가 쌍자엽 식물체에 tumor를 형성시키는 초기단계를 연구하였다.

*A. tumefaciens*가 tumor를 형성하지 못하는 이유는 i) bacteria가 식물체에 부착되지 못하는 경우, ii) *vir* gene 유도물질이 식물체에 존재하지 않는 경우, iii) T-DNA가 식물 숙주세포로 전이가 안 될 경우, 또는 iv) T-DNA가 식물 숙주세포 DNA내로 전이는 됐으나 발현이 안 될 경우 등

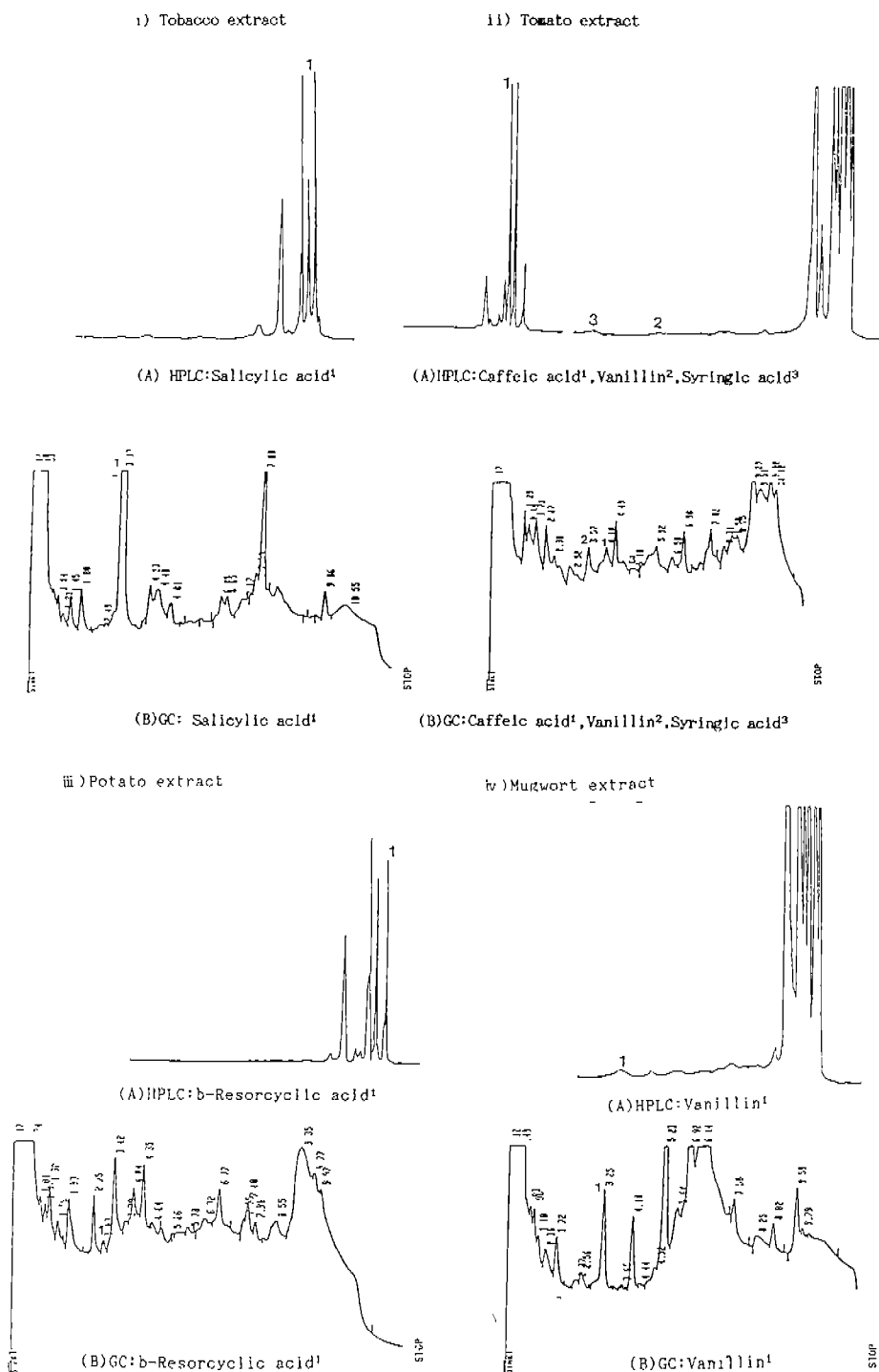


Fig. 1. Chromatogram of phenolic compounds in six dicotyledonous plants by HPLC(A) and GC(B). HPLC condition: μ Bondapak C¹⁸ column with mobile phase was 10% Acetonitril (flow rate 1 ml min⁻¹) and absorbance were 280 nm. GC condition: capillary column HPLI (Methylsilicon Gum 10m \times 0.53 mm \times 2.65 μ m) with column temperature program, 80 $^{\circ}$ C (for 1 min) to 270 $^{\circ}$ C at 20 $^{\circ}$ C min⁻¹ (linear velocity for nitrogen carrier gas, 35 ml min⁻¹) and FID detector.

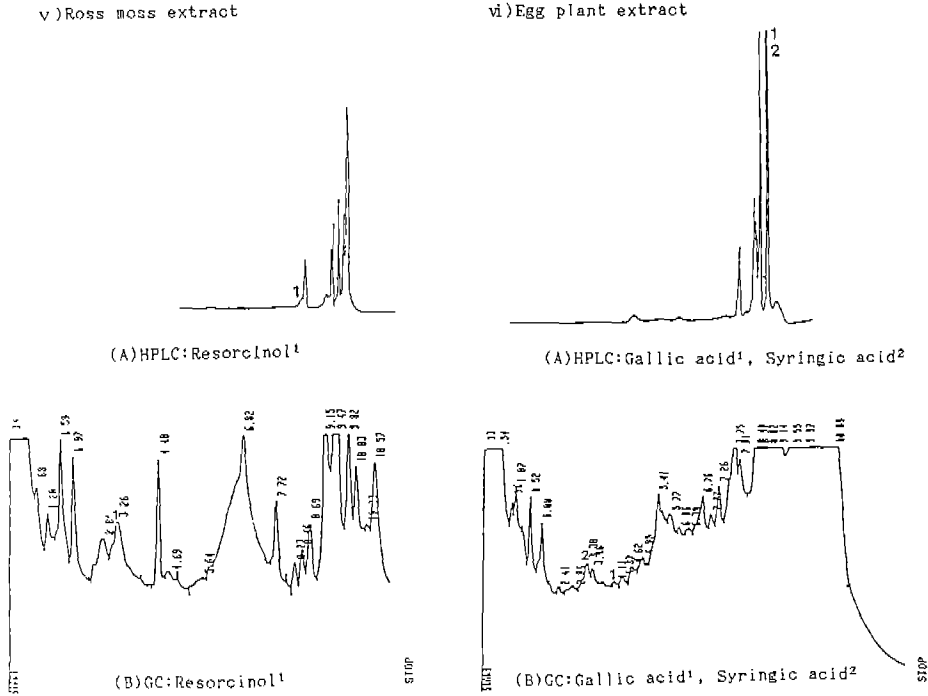


Fig. 1. Continued

Table 2. The phenolic compounds in dicotyledonous plants

Plants		Phenolic compounds
Species name	Common name	
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tobacco	salicylic acid
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomato	caffeic acid
		vanillin
		syringaldehyde
<i>Solabnum tuberosum</i>	Potato	β -resorcylic acid
<i>Aemisia princeps</i> Var. <i>Orientalis</i>	Mugwort	vanillin
<i>Portulaca grandiflora</i>	Ross moss	resorcinol
<i>Solanum melongena</i>	Egg plant	gallic acid gyringic acid

이다.

본 논문에서는 KU12가 쌍자엽 식물체에 따라 tumor를 형성시키는 차이를 조사하기 위하여 먼저 Ti-plasmid *vir* gene의 발현을 유도시켜 주는 phenol 화합물을 조사하여 유도물질 15종을 알아냈다. 이 중에서 A348(pTiA6)에서도 유도물질로 작용한 것은 6가지(acetosyringone, ferulic acid, vanillin, β -resorcylic acid, gallic acid, syringaldehyde)이며, 유도물질이 아닌 것은 7가지(p-nitrophenol, ca-

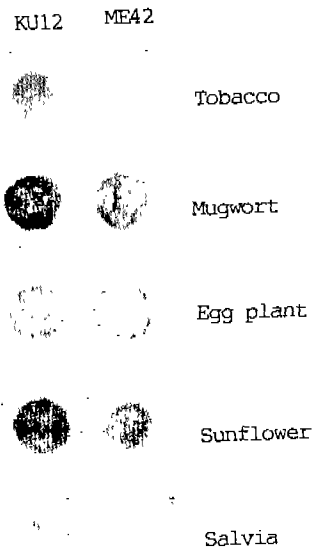


Fig. 2. The attachment test of five dicotyledonous plants. Among these, tumors were formed on tobacco by *A. tumefaciens* KU12, but not formed on mugwort, egg plant, sunflower and salvia. In these experimental data, the black leaf disc expresses a positive attachment, whereas the white leaf disc does a negative attachment.

techol, pyrogallol, benzoic acid, resorcinol, salicylic acid, vanillic acid)이다. 반면, syringic acid는 A348(pTiA6)에서 유도물질로 작용하지만 KU12에서는 *vir* gene의 발현을 유도하지 못했다(Stachel *et al.*, 1985b; Bolton *et al.*, 1986; Ashby *et al.*, 1988). 이러한 발현 유도 여부는 유도배지의 pH에 따라서 매우 큰 영향을 받는다. 즉, pH가 5.0-5.5 정도 일 때 발현이 잘 되며, 6.0 이상이나 5.0 이하에서는 발현이 안된다(Stachel *et al.*, 1986; Vernade *et al.*, 1988).

이 후 tumor를 형성한 쌍자엽 식물체와 형성하지 못하는 쌍자엽 식물체내에 존재하는 phenol 화합물을 비교 분석하여, tumor 형성능이 없는 쪽, 채송화, 가지 등에서도 유도물질로 작용하는 phenol 화합물이 존재함을 확인하였다. 그러나, 가지나 채송화에 존재하는 유도물질은 담배나 토마토에 존재하는 유도물질보다 그 양이 적게 존재한다.

한편, HPLC와 GC를 동시에 사용한 이유는 HPLC 440 detector가 280 nm 단일 파장만을 갖고 있으므로, 파장 흡수치가 차이나는 phenol 화합물에 대한 실험치를 보완하지 위해서였다. 즉, phenol 화합물들은 종류마다 서로 다른 UV 흡수 파장을 가지므로 파장 흡수가 280 nm에서 크게 벗어나는 화합물들은 HPLC를 사용했을 때 peak의 확인이 어렵기 때문이었다.

또한, tumor를 형성하지 못하는 쌍자엽 식물체를 가지고 KU12의 부착능력을 조사해 본 결과 가지, 실비아 등에는 KU12의 부착 정도가 아주 낮았다. 따라서, KU12가 쌍자엽 식물체에 따라 tumor를 형성하지 못하는 이유는 여러 가지 있겠으나, 채송화의 경우는 유도물질이 극소량 존재하기 때문이며, 가지나 실비아의 경우는 극소량의 유도물질이나 불충분한 부착이 이유가 될 수 있다고 생각된다.

적 요

한국산 *Agrobacterium tumefaciens* KU12내 Ti-plasmid의 *vir* gene의 발현을 유도할 수 있는 phenol 화합물을 조사하기 위하여, pSM358cd로 형질전환된 KU12내 *vir* operon의 발현이 *vir* 유전자 발현의 유도자로 알려진 18가지 phenol 화합물에 의하여 유도되는지를 실험하였다. 또한 *A. tumefaciens* KU12에 의하여 tumor가 형성되지 않는 몇몇 쌍자엽 식물들의 경우 그 이유를 구명하기 위한 연구의 일환으로써, 그들 쌍자엽 식물체내에 존재하는 phenol 화합물과 *A. tumefaciens* KU12에 대한 부착성을 조사하였다.

이상의 연구결과, 18개의 phenol 화합물 중 15개는 KU12내 Ti-plasmid의 *vir* 유전자 발현을 유도했으며, KU12에 의하여 tumor가 형성되지 않는 쌍자엽 식물들 중 가지나 채송화는 KU12의 *vir* operon의 발현을 유도하는 phenol 화합물을 극소량 가지고 있었으며, 가지나 실비아의 경우는

극소량의 유도성 phenol 화합물을 가지고 있었을 뿐만 아니라, *A. tumefaciens* KU12에 대한 부착성도 아주 낮았다.

사 사

본 논문은 교육부의 1990-1991년도 대학부설 기초과학연구소 학술연구조성비에 의한 결과임.

참 고 문 헌

Ashby, A.M., M.D. Watson, G.J. Looke and C.H. Shaw. 1988. Ti Plasmid specified cheotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58 toward *vir*-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *J. Bacteriol.* **170**: 4181-4187.

Bevan, M.W. and M.D. Chilton. 1982. T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmid. *Annu. Rev. Genet.* **16**: 357-384.

Bolton, G.W., E.W. Nester and M.P. Gorden. 1986. Plants phenolic compounds induces expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci; needed for virulence. *Science.* **232**: 983-985.

Bonner, J. and A.W. Galston. 1959. In, Principle of plant physiology. W.H. Freen (ed.), San Francisco.

Chilton, M.D., T.C. Currier, S.K. Farrand, A.J. Bendich, M.P. Gorden and E.W. Nester. 1974. *Agrobacterium* DNA PS8 bacteriophage DNA not detected in crown tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**: 3672-3676.

Christie, P.J., J.E. Ward, S. Winans and E.W. Nester. 1988. The *Agrobacterium tumefaciens vir* E2 gene product is a single stranded DNA binding protein that associates with T-DNA. *J. Bacteriol.* **170**: 2659-2667.

Dell, A., W.S. York, M.Mcneil, A.G. Darvil and P. Aalbersheim. 1983. The cycle structure of β -D-(1,2)-linked D-glucans secreted by *Rhizobia* and *Agrobacteria*. *Carbohydr. Res.* **117**: 185-200.

Douglas, C.J., W. Halperin and E.W. Nester. 1982. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affect in attachment to plant cell. *J. Bacteriol.* **152**: 1265-1275.

Douglas, C.J., R.J. Staneloni, R.A. Rubin and E.W. Nester. 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* **161**: 850-860.

Engstrom, P., P. Zambryski, M. Van Montagu and S.E. Stachel. 1987. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins induced by the plant factor acetosyringone. *J. Mol. Biol.* **197**: 635-645.

Hille, J., J. Van Kan and R. Shilperoort. 1984. Trans-acting virulence functions of the octopine Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **158**: 754-756.

Leroux, B., M.F. Yanofsky, S.C. Winans, J.E. Ward, S.F. Zieg-

- ler and E.W. Nester. 1987. Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: A transcriptional regulator and host range determinant. *EMBO J.* **6**: 849-856.
- Miller, J.H. 1972. *In*, Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Muchitch, M.J. and J.S. Fletcher. 1984. Isolation and Identification of the Phenols of Paul's Scarlet Rose Stems and Stem-Derived Suspension Culture. *Plant Physiol.* **75**: 592-595.
- Noggle, G.R. and G.J. Fritz. 1983. Plant growth substances: structure and physiological effects. *In*, Introductory Plant Physiology. 2nd edition. Prentice-Hall, New Jersey. pp. 417-450.
- Paepke, S.G. and M.C. Hawes. 1985. Understanding the building of bacteria to plant surface. *Trends Biotechnol.* **3**: 310-313.
- Stachel, S.E., G. An, C. Flores and E.W. Nester. 1985a. A Tn3 *lacZ* transposon for the random generation of β -galactosidase gene fusions; Application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. *EMBO J.* **4**: 891-898.
- Stachel, S.E., E. Messens, M.V. Montague and P. Zambryski. 1985b. Identification of the signal molecules produced by in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318**: 624-629.
- Stachel, S.E. and E.W. Nester. 1986. The genetic and transcriptional organization at the *vir* region of the pTiA6 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* **5**: 1445-1454.
- Stachel, S.E., E.W. Nester and P.C. Zambryski. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 379-383.
- Vernade, D., H.E. Alfredo, W. Kan and M.V. Montague. 1988. Glycine betain allows enhanced Induction of the *Agrobacterium tumefaciens vir* genes by acetosyringone at low pH. *J. Bacteriol.* **170**: 5822-5829.
- Yanofsky, M.F., S.G. Ponter, C. Yong, L.M. Albright, M.P. Gordon and E.W. Nester 1986. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* **47**: 471-477.
- Zambryski, P., J. Tempe and J. Schell. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmid in plants. *Cell* **56**: 193-201.

(1991. 9. 2 接受)