

## Agrobacterium rhizogenes를 이용한 Populus tremuloides의 형질전환

류기중<sup>1\*</sup> · 소인섭<sup>1</sup> · 유장길<sup>1</sup> · 고영환<sup>1</sup> · 이선주<sup>1</sup> · Wesley P. Hackett<sup>2</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 방사능이용연구소,

<sup>2</sup>Department of Horticultural Science, University of Minnesota, USA

**초록 :** *Agrobacterium rhizogenes*를 매개로 한 *Populus*의 형질전환계를 확립하고자 형질전환율에 영향을 주는 주요 인자들을 검토하고, 형질전환 식물체를 분화시켜 도입유전자의 발현을 확인하였다. 줄기조직보다 잎 조직이 kanamycin에 대한 감수성이 커 형질전환체의 선발에 유리한 것으로 판단되었다. 접종용액의 박테리아 밀도는  $4 \times 10^5 \sim 7 \times 10^9$  cfu의 범위내에서 형질전환율에 거의 영향을 주지않았다. 공배양 기간은 1일 이내가 바람직하였고, 박테리아 제거배지의 항생제 농도는 cefotaxime과 ampicillin 각각 250 µg/ml가 적당하였다. 배지에 acetosyringone을 첨가하여 배양한 박테리아를 사용했을 때 형질전환율이 증가했는데 acetosyringone의 적정농도는 50 µM이었다. 형질전환된 gall은 kanamycin 농도가 100 µg/ml 이상인 배지를 사용하거나, 성장 조절제가 들어있지 않은 배지를 사용하여 선택적으로 유기 및 증식시킬 수 있었다. *A. rhizogenes*를 접종시킨 조직으로부터 유기된 gall은 성장조절제를 포함하는 배지 뿐만아니라, 성장조절제가 없는 배지에서도 3주 이내에 뿌리를 형성하였다. NAA 0.05 mg/ml와 BA 0.5 mg/ml를 첨가한 배지에서 배양된 gall로부터 약 6주일 후 식물체가 분화되었다. *A. rhizogenes*를 접종시켜 얻은 gall, 그리고 gall로부터 재분화된 식물체의 추출물에서 agropine과 mannopine이 검출되어, 도입된 opine합성 유전자가 발현되고 있는 것이 확인되었다(1995년 4월 6일 접수, 1995년 4월 26일 수리).

### 서 론

*Populus*는 경제적으로 유용할 뿐만아니라 생육이 빠르고<sup>1)</sup> 조직배양에 의한 식물체분화 조건이 비교적 잘 확립되어 있어서<sup>2-5)</sup> 목본류의 형질전환 모델로 많이 이용되고 있다. 지금까지 *Populus*의 형질전환에는 숙주 범위가 넓은 *Agrobacterium tumefaciens*가 주로 사용되어 왔는데,<sup>6,7)</sup> *Populus*의 종류에 따라 감염능력이 낮아 형질전환율이 저조한 경우가 있고, *A. tumefaciens*를 사용하는 경우에 형질전환에 의해 유기된 gall이 형질전환되지 않은 보통의 callus와 모양이 같기 때문에 양자를 형태로 구별하기 어려운 점이 있다.

*A. rhizogenes*는 *A. tumefaciens*보다 *Populus*에 대해 숙주범위가 좁지만<sup>8)</sup> Ti Plasmid의 *vir* region을 도입하면 감염능력을 높일 수 있다.<sup>9)</sup> 그리고 *A. rhizogenes*에 의해 형질전환된 세포는 hairy root를 형성하기 때문에 형질전환되지 않은 callus와 쉽게 구별된다.<sup>10,11)</sup> 또 *A. rhizogenes*의 감염에 의해 유기되는 gall은 보통 *A. tumefaciens*에 의해 유기된 것 보다 식물체로 재분화되기 쉽기 때문에 근래에는 *A. rhizogenes* system에 의한 *Populus*의 형질전환이 시도되고 있다.<sup>9)</sup> 뿐만아니라 *Populus*의 경우 뿌리배양에 의한 시험관내에서의 clonal propagation이 실용화되고 있는데,<sup>12)</sup> *A. rhizogenes*를 이용하면 hairy root로부터 대량의 뿌리를 얻을 수 있다는 장점이 있다.<sup>13)</sup>

본 연구는 *A. rhizogenes*에 의한 *Populus*의 형질전환

계를 확립하고자 형질전환율에 미치는 주요 요인들을 검토하고, 형질전환 세포로부터 식물체를 재분화시키고 재분화된 식물체 내에서 도입된 유전자가 발현됨을 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 식물재료 및 조직배양

*Populus tremuloides*를 사용하였다. Kanamycin에 대한 조직의 감수성은 어린 줄기와 잎의 절편에 대하여 조사했는데, 줄기는 직경 2 mm×길이 7 mm, 잎은 가로 2 mm×세로 7 mm의 크기의 절편을 사용했다. Kanamycin 감수성조사 이외의 실험에는 모두 잎절편을 사용하였다. 조직배양에는 ACM(aspen culture medium)<sup>14)</sup>을 기본배지로 사용하였다.

#### *A. rhizogenes* strain, 배양 및 접종

Auxin/cytokinin, nptII 및 agropine/mannopine 유전자와 pTiB0542의 *vir* 영역을 가지고 있는 *A. rhizogenes* R1601(pRia4b)을 사용했다.<sup>9,15)</sup> 박테리아는 kanamycin(100 µg/ml)을 첨가한 MG배지<sup>16)</sup>를 사용하여 28.5°C에서 250 rpm으로 48시간 배양하여 접종에 사용하였다. 식물조직은 MG배지에  $4 \times 10^8$  cfu/ml되게 조절된 박테리아 현탁액에 2시간 침지하는 방법으로 접종시켰다.

찾는말 : *Agrobacterium rhizogenes*, *Populus tremuloides*, transformation, opine, acetosyringone

\*연락처

**공배양과 gall의 유기 및 선발**

박테리아접종 후 식물조직을 NAA (0.5 mg/ml), BA (0.5 mg/ml), acetosyringone (50 μM)을 포함한 ACM agar 배지(pH 5.5)에서 암조건으로 28°C에서 공배양하였다. 공배양이 끝난 식물조직은 NAA(0.5 mg/l), BA(0.5 mg/l), cefotaxime(250 μg/ml), ampicillin(250 μg/ml), kanamycin (100 μg/ml)을 포함한 ACM agar 배지(agar; 0.9%, pH; 5.5)에 옮겨 7일간 28°C 암조건으로 배양함으로써 박테리아를 제거함과 동시에 형질전환된 gall을 유기시켰다. 유기된 gall은 생장조절제를 첨가하지 않은 배지에서 최종 선발하였다.

**형질전환체의 배양 및 기관분화**

선발된 gall의 배양은 NAA(0.5 mg/l)와 BA(0.5 mg/l)을 포함한 ACM agar 배지(pH 5.5)에서 28°C의 광조건으로 하였다. 뿌리의 유기는 NAA 0.05 mg/l와 BA 0.05 mg/l을 포함한 배지에서, 지상부의 유기는 NAA 0.05 mg/l와 BA 0.5 mg/l을 포함한 배지에서 28°C, 광 16시간/암 8시간 조건으로 하였다.

**Opine 분석**

식물조직으로부터 95% ethanol(100 μl/100 mg tissue)을 사용하여 opine을 추출했다. 분리는 Rogers<sup>17)</sup>의 여지전기영동 방법으로 하였는데, 완충용액(pH 1.9)으로는 formic acid/acetic acid/water을 5:15:80으로 혼합한 것을 사용했다. 전기영동이 끝난 여지에 AgNO<sub>3</sub>용액(포화용액 2.5 ml를 acetone 1l에 녹인것)을 분무하여 건조한 다음, 2% NaOH/methanol 용액을 분무하고, 5% sodium thiosulfate 용액을 분무하여 opine을 검출하였다.

**결과 및 고찰**

**식물체 조직의 kanamycin 감수성**

*Agrobacterium*을 사용한 *Populus*의 형질전환 목적으로 지금까지 주로 사용되어 온 것은 줄기절편<sup>69)</sup>인데, 줄기는 단단하고 두께가 두껍기 때문에 물질의 침투확산이 어려워 선발물질에 대한 감수성이 낮을 것으로 생각된다. 반면 잎은 비교적 조직이 부드럽고 두께가 얇기 때문에 줄기에 비해 물질의 침투확산이 용이해 선발물질에 대한 감수성도 클 것으로 예상되어 잎과 줄기 절편의 kanamycin 감수성을 조사비교하였다.

Fig. 1은 NAA(0.05 mg/l)와 BA(0.05 mg/l)를 포함한 ACM배지에 kanamycin을 0, 50, 100, 200, 500 μg/ml이 되게 첨가한 배지에서 각 조직을 25일간 배양하여 callus 형성능력을 조사한 결과이다. 조사된 줄기절편 중에서 callus를 형성한 절편의 비율은 kanamycin 농도 100 μg/ml에서 95%, 200 μg/ml에서 53%였고, 500 μg/ml에서 24%였다. 반면 잎 조직은 kanamycin농도 50 μg/ml에서 callus를 형성한 절편의 비율이 8%에 지나지 않았고, 100 μg/ml 이상에서는 callus가 형성되지 않았을 뿐만 아니라 조직이 모두 죽어 예상된 바와 같이 줄기조직에 비해

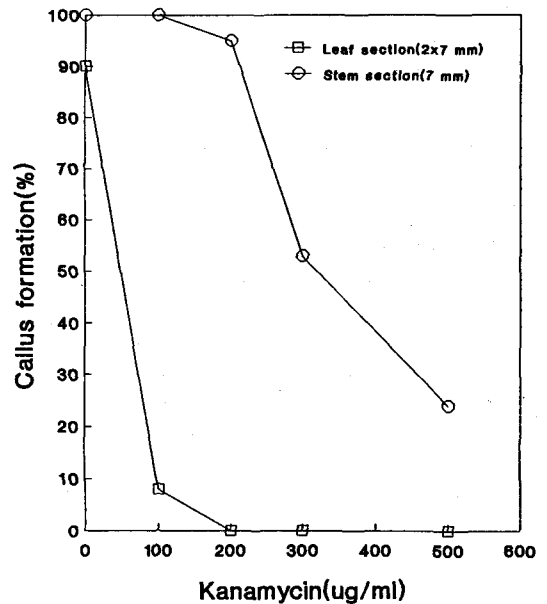


Fig. 1. Sensitivity of stem and leaf section to kanamycin. The sections were cultured on ACM agar medium containing each level of kanamycin. The callus formation rate was measured after 25 day culture. Forty sections of leaf and twenty one sections of stem were tested, respectively, for each treatment. The callus formation rate was expressed as % of callus-formed section.

kanamycin에 대한 감수성이 훨씬 큰 것으로 나타났다. 그러므로 kanamycin을 선발물질로 사용하는 형질전환계에는 줄기조직보다 감수성이 큰 잎 조직을 사용하는 것이 형질전환되지 않은 세포로부터 형질전환된 세포를 선발하는데 보다 유리한 것으로 생각되어 본 실험에서는 잎 조직을 사용하였다.

**박테리아의 배양 및 접종 조건**

접종에 사용되는 박테리아의 양에 따라 형질전환율이 달라질 가능성이 있어서, 박테리아 현탁액의 박테리아 밀도를 달리하여 조사하였다. Table 1은 박테리아의 밀도를 4×10<sup>5</sup>, 4×10<sup>6</sup>, 4×10<sup>7</sup>, 4×10<sup>8</sup>, 7×10<sup>9</sup> cfu/ml로 조절한 현탁액에 잎 조직을 침지접종한 다음, 3주후 gall을 형성한 조직의 비율을 조사한 결과이다.

접종에 사용된 현탁액의 박테리아 밀도가 4×10<sup>5</sup>, 4×10<sup>6</sup>, 4×10<sup>7</sup>, 4×10<sup>8</sup>, 7×10<sup>9</sup> cfu/ml일 때 gall을 형성한 조직의 비율은 각각 94, 97, 92, 93, 93%로 큰 차이가 없었다. 그러므로 박테리아는 48시간 정도 배양한 후 밀도를 조절할 필요없이 그대로 사용해도 무관한 것으로 생각된다.

*Agrobacterium virulence* 유전자의 발현이 acetosyringone에 의하여 유기되고, acetosyringone에 의한 이 유전자 발현의 유기 정도는 박테리아 배양배지의 pH에 따라 다른 것으로 알려져 있어서<sup>18)</sup>, pH와 acetosyringone의 농도를 달리한 MG배지에서 배양한 박테리아로 접종한 조직의 gall 형성율을 조사하였다(Fig. 2).

배지에 acetosyringone을 첨가하지 않고 배양한 박테

Table 1. Effect of bacterial density in soaking suspension on gall formation of leaf section

	Bacterial density (cfu/ml)				
	4×10 <sup>5</sup>	4×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>7</sup>	4×10 <sup>8</sup>	7×10 <sup>9</sup>
Total No. of section	34	33	35	40	67
Gall formed section	32	32	32	37	62
% of gall-formed section	94	97	92	93	93

The gall formation was measured after 3 week culture.

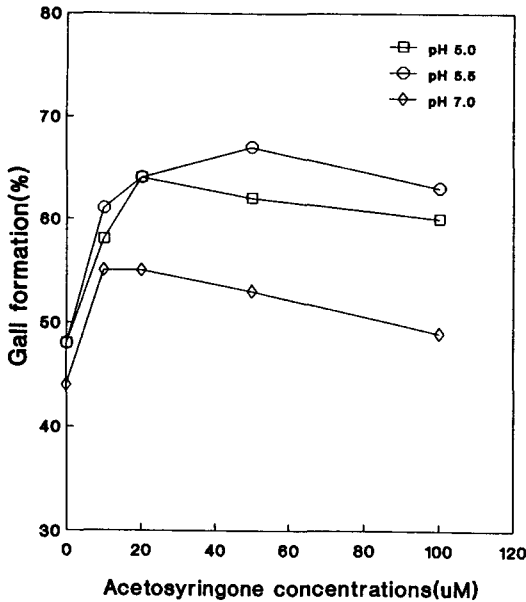


Fig. 2. Effect of acetosyringone in the medium for bacterial culture on transformation rate. The bacteria cultured in the MG medium of each pH and each level of acetosyringone were resuspended in the same corresponding medium. The leaf sections were soaked 2 hours in the bacterial suspension for inoculation. The gall formation was measured after 3 week culture on the growth regulator-free medium.

리아를 접종한 경우에 3주후 gall을 형성한 조직의 비율은 50% 미만이었다. 반면 acetosyringone 첨가배지에서 배양한 박테리아를 사용했을 때 조직의 gall 형성율이 증가했는데 증가정도는 박테리아 배양배지의 pH와 acetosyringone의 농도에 따라 달랐다. 조사된 3가지 pH중 5.5에서 가장 큰 증가율을 보였으며 이 pH에서 acetosyringone의 농도가 50 µM일 때 가장 높은 gall형성율을 보였다. 그러므로 박테리아는 pH가 5.5이고 acetosyringone농도가 50 µM인 배지에서 배양하여 사용하는 것이 가장 좋은 것으로 나타났다.

**공배양 및 박테리아 제거**

박테리아 현탁액에 식물조직을 침지접종한 다음 조직을 일단 항생제가 없는 배지에 옮겨 일정기간 배양하게 되는데, 이 때의 공배양 시간에 따라 형질전환율이

Table 2. Effects of co-cultivation period on the efficiency of gall induction and bacterial elimination

	Co-cultivation period (day)				
	0	1	2	4	10
Gall-formed section (%)	73	85	86	88	58
Section without bacterial growth (%)	100	95	92	62	47

The efficiency of gall formation was expressed as % of the gall-formed section and the efficiency of bacterial elimination was expressed as % of the section showed no apparent bacterial growth. The gall formation and bacterial growth were measured after 2 week culture on growth regulator-free medium.

달라질 수 있기 때문에 공배양 시간별 조직의 gall 형성율을 조사하였다. Table 2에서 보는 바와같이 10일간 공배양한 경우에는 오히려 감소하였지만 4일 까지는 공배양 시간이 길 수록 gall을 형성한 조직의 비율이 다소 증가하는 경향을 보였다.

한편 공배양 시간을 길게 할 때 박테리아의 밀도가 지나치게 높아져 항생제 첨가배지에서 박테리아를 제거하는 단계에서 문제가 생길 수 있다. 그러므로 공배양이 끝난 조직을 cefotaxime 250 µg/ml과 ampicillin 250 µg/ml을 첨가한 배지에 옮겨 2주간 배양하는 동안 박테리아가 함께 증식하는 조직의 비율을 조사했다. Table 2에서 보는 바와같이 공배양 기간이 길 수록 박테리아가 출현한 조직의 비율도 급격히 증가하였는데, 1일 공배양한 경우 오염율이 5% 였으나 4일인 경우 38%나 되었다. 이와같이 공배양시간을 길게할 때 gall을 형성한 조직의 비율은 증가하여 다소 유리하지만, 박테리아가 제거되지 않는 조직의 비율이 급격히 증가하므로, 공배양 기간은 오염율 5%인 1일 이내로 하는 것이 바람직하였다.

공배양 후 조직을 항생제 배지에 옮겨 박테리아를 제거해야 하는데 A. rhizogenes의 제거목적으로 흔히 사용되는 항생제인 cefotaxime과 ampicillin에 대해 박테리아 제거효율을 조사하였다. 또 이들 항생제는 박테리아의 생육 뿐만 아니라, 식물세포의 생육에도 영향을 줄 것으로 생각되어 gall 형성율에 대한 이들의 영향도 아울러 조사하였다. Table 3은 접종된 조직을 2일간 공배양한 다음 각 항생제의 농도를 달리한 배지에 옮기고, 2주후 박테리아가 출현한 조직의 비율과 gall을 형성하는 조직의 비율을 관찰한 결과이다.

Cefotaxime은 100 µg/ml 까지의 농도에서 조사된 조직중 80% 이상이 박테리아의 생장을 보였으나 250 µg/ml에서는 급격히 낮아져 박테리아의 생장이 관찰된 조직은 5% 미만이 되었다. Ampicillin의 경우도 농도가 증가함에 따라 박테리아 생장이 관찰된 조직의 비율은 감소하였으나 250 µg/ml에서 약 50%의 조직에서 박테리아 생장이 관찰되었고, 오염율 5% 이하로 줄이기 위해서는 1000 µg/ml가 되어야 하는 것으로 나타났다. 한편

Table 3. Effects of cefotaxime and ampicillin in the tissue culture medium on gall induction and bacterial elimination

		Concentration of antibiotics ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		0	50	100	250	500	1000
Gall formation (%)	Cefotaxime	95	88	70	38	—	—
	Ampicillin	95	89	87	80	45	38
Section without bacterial growth (%)	Cefotaxime	0	12	18	95	—	—
	Ampicillin	0	17	24	65	52	95

The efficiency of gall formation was expressed as % of the gall-formed section and the efficiency of bacterial elimination was expressed as % of the section showed no apparent bacterial growth. The gall formation and bacterial growth were measured after 10 day culture on growth regulator free medium.

Table 4. Formation of callus from the non-inoculated section and gall from the *A. rhizogenes*-inoculated section on the medium with or without growth regulators and kanamycin after 2 week culture

Medium	Non-inoculated section			Inoculated section		
	Total	Callus-formed	%	Total	Gall-formed	%
A	43	0	0	31	23	74
AK	45	0	0	18	11	61
ANB	45	45	100	30	18	60
ANBK	45	0	0	14	12	86

A: ACM basal medium, AK: ACM with kanamycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ), ANB: ACM with NAA (0.5 mg/l) and BA (0.5 mg/l), ANBK: ACM with NAA (0.5 mg/l), BA (0.5 mg/l) and kanamycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

이들 항생제들은 모두 농도가 높을 수록 gall형성을 저하시키는 것으로 나타났는데, gall형성 조직의 비율이 250  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 cefotaxime의 경우 약 40%, ampicillin의 경우 약 80%로 gall형성은 전자 보다 후자에 의해 크게 저하되는 것으로 나타났다. 그러므로 박테리아 제거효율과 gall형성을 동시에 고려할 때 각 항생제를 단독하기 보다 혼용하는 것이 효과적인 것으로 판단되었다. 실제 cefotaxime과 ampicillin을 250  $\mu\text{g/ml}$ 씩 혼용하였을 때 gall형성은 82%로 비교적 높게 나타났고 이 경우 오염율은 5%이하가 되어 실용적인 적정 조건으로 간주되었다.

#### 형질전환체의 선발 및 기관분화

형질전환된 세포를 성장조절제가 없는 배지 또는 kanamycin 첨가배지에서 보통의 callus와 구별하여 선별적으로 유기증식시킬 수 있는 지를 보기 위하여, 성장조절제와 kanamycin을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지상에서 *A. rhizogenes*를 접종하지 않은 잎조직의 callus형성능력과 접종한 조직의 gall형성능력을 조사하였다(Table 4). 박테리아를 접종한 조직의 경우 cefotaxime과 ampicillin을 250  $\mu\text{g/ml}$ 씩 첨가한 배지에서 2주일간 배양하여 박테리아를 제거하는 과정을 거친 다음 이들 항생제가 들어있지 않은 배지에 옮겨 2주일간 배양하여 gall형성여부를 조사하였다.

*A. rhizogenes*를 접종하지 않은 조직절편의 경우 성장

Table 5. Root formation from *A. rhizogenes*-incited gall on the ACM medium containing NAA and BA

BA (mg/l)	NAA (mg/l)				
	0	0.005	0.05	0.5	5
0	59	17	47	5	7
0.005	—	14	27	25	13
0.05	22	31	35	32	—
0.5	24	27	11	21	10
5	0	0	0	0	0

The figures are % of the gall formed roots after 6 week culture.

조절제를 첨가한 배지(ANB)에서는 모두 callus를 형성하였지만 성장조절제가 없는 배지(A)의 조직절편에서는 callus가 형성되지 않았다. 반면 이 박테리아를 접종한 조직절편에서는 성장조절제가 들어 있는 배지에서 뿐만 아니라 들어있지 않은 배지에서도 gall형성이 관찰(전체 조직중 74%)되었다. 또 kanamycin 배지 AK와 ANBK에서 박테리아를 접종하지 않은 조직절편들이 callus를 형성하지 않은 반면 접종한 조직절편들은 각각 61%와 86%가 gall을 형성하였다. 그러므로 성장조절제를 첨가하지 않은 배지나 kanamycin 배지에서 형질전환된 세포가 선택적으로 유기증식된다는 것을 알 수 있었다.

Table 5는 *A. rhizogenes*를 접종한 조직으로부터 유기시킨 gall을 성장조절제의 농도가 다른 배지에서 배양하여 뿌리를 형성한 gall의 비율을 조사한 결과이다. 뿌리의 형성은 배양후 약 3주일 부터 관찰되었으나 Table 5의 수치는 6주일간 배양하여 조사한 것이다. 뿌리의 형성은 NAA의 경우 0~5 mg/l의 농도범위 내에서, BA의 경우 0~0.5 mg/l의 농도범위 내에서 관찰되었는데, gall의 뿌리형성은 성장조절제가 들어있지 않은 배지에서 오히려 높았다. NAA 0.05 mg/l와 BA 0.5 mg/l를 첨가한 배지에 배양된 gall로부터 약 6주일 후 식물체가 분화되었다. 그러나 본 실험에서는 단지 2개의 식물체만을 얻을 수 있었으므로 지상부 분화 조건은 앞으로 더욱 개선되어야 할 것으로 생각되었다.

#### 형질전환 식물체내에서의 도입유전자 발현

*A. rhizogenes*를 접종시켜 얻은 형질전환체로서 뿌리를

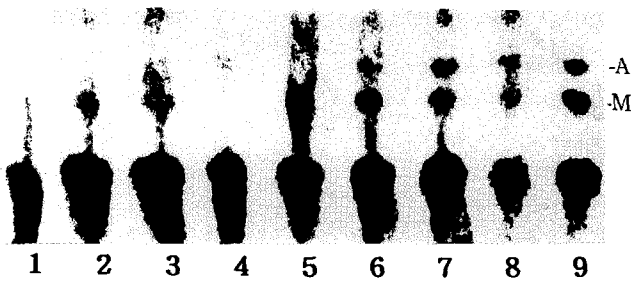


Fig. 3. Opine production by transformants. 1, non-transformed leaf; 2, non-transformed callus; 3, non-transformed rooting callus; 4, non-transformed root; 5, transformed gall; 6, transformed rooting gall; 7, transformed root; 8, transformed shoot; 9, *A. tumefaciens* A281-incited gall producing agropine and mannopine; A, agropine; M, mannopine.

형성하는 gall과 뿌리를 형성하지않는 gall, gall로부터 재분화된 식물체의 뿌리와 지상부 각각에 대해 agropine과 mannopine 생성여부를 조사하였다. 대조구로서 *A. rhizogenes*를 접종시키지 않은 식물체의 잎, 잎에서 유기시킨 callus, callus 중 뿌리를 형성하는 것, callus에서 유래된 뿌리에 대해서도 조사하였다.

*A. rhizogenes*를 접종시키지 않은 식물체의 잎, 잎에서 유기시킨 callus, callus 중 뿌리를 형성하는 것, callus에서 유래된 뿌리의 추출물에서는 agropine과 mannopine이 검출되지 않았다. 다만 callus 추출물들에서 mannopine과 동일한 이동도를 가진 물질의 흔적이 관찰되었는데, *Agrobacterium*에 감염되지 않은 정상적인 식물조직에서는 opine이 합성되지 않는 것으로 알려져있기 때문에<sup>19)</sup> 이 물질은 mannopine이 아닌 것으로 생각되었다.

한편 *A. rhizogenes*를 접종시켜 얻은 gall 중 뿌리를 형성하는 것과 뿌리를 형성하지 않는 것, 그리고 gall로부터 재분화된 식물체의 뿌리 및 지상부의 추출물에서는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 모두 agropine과 mannopine이 검출되어, 이들 조직에 *A. rhizogenes*의 Ri plasmid로부터 유래된 opine 합성 유전자가 도입되어 발현되고 있음을 알 수 있었다.

### 감사의 글

이 논문은 1993년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었으므로 이에 감사를 드립니다.

### 참고 문헌

1. International Poplar Commission (1979) Poplars and willows in wood Production and land use. FAO Forestry Series, No. 10. Rome.
2. Lee-Stadelmann, O. Y., S. W. Lee, H. J. Chung, Q. S. Guo, M. W. Kim, C. H. Park, W. P. Hackett (1989) Optimizing potential for adventitious shoot organogenesis in hybrid *Populus* explants in vitro with wound treatment and microsections. pp. 45-58. In: Woody Plant Biotechnology. M.R. Ahuja(ed.), NATO Advanced Science Institute Series, 210.

- New York, Plenum Press.
3. Lee-Stadelmann, O. Y., S. W. Lee, W. P. Hackett, and P. E. Read (1989) The formation of adventitious buds in vitro on micro-cross sections of hybrid *Populus* leaf midveins. *Plant Sci.* **61**, 263-272.
4. Chalupa, V. (1974) Control of root and shoot formation and production of trees from poplar callus. *Biol. Plant.* **16**, 316-320.
5. Son, S. H. and R. B. Hall (1990) Multiple shoot regeneration from root organ culture of *Populus alba* x *P. grandidentata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **20**, 53-57.
6. Parsons, T. J., V. P. Sinkar, R. F. Stettler, E. W. Nester, and M. P. Gordon (1986) Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. *BioTechnology* **4**, 533-536.
7. De Cleene, M., and J. De Ley (1976) The host range of crown gall. *Bot. Rev.* **42**, 389-466.
8. De Cleene, M., and J. De Ley (1981) The host range of infectious hairy root. *Bot. Rev.* **47**, 147-194.
9. Pythoud, F., V. P. Sinkar, E. W. Nester, and M. P. Gordon (1987) Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the *vir* region of pTiBo542: Application to genetic engineering of poplar. *BioTechnology* **5**, 1323-1327.
10. Sinkar, V. P., White, F. F., and M. P. Gordon (1987) Molecular biology of Ri-plasmid. A review. *J. Bioscience* **11**, 47-57.
11. Chiton, M. D., D. A. Tepfer, A. Petit, C. David, F. Casse-Delbart, and J. Tempe (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. *Nature* **295**, 432-434.
12. Hall, R. B., J. P. Colletti, R. C. Schultz, R. R. Faltonson, S. H. Kolison Jr, R. D. Hanna, T. D. Hillson and J. W. Morrison (1989) Commercial-scale vegetative propagation of aspen, Proc. Aspen Symposium, July 25-27, Duluth, MN, pp. 211-219.
13. Strobel, G. A. and A. Nachmias (1985) *Agrobacterium rhizogenes* promotes the initial growth of bare root stock almond. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1245-1249.
14. Ahuja, M. R. (1983) Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. *Silvae Genetica*, **32**, 131-135.
15. White, F. F., B. B. Taylor, G. A. Huffman, M. P. Gordon, and E. W. Nester (1985) Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* **164**, 33-44.
16. Roberts, W. P. and A. Kerr (1974) Crown gall induction: serological reactions, isozyme patterns and sensitivity to mitomycin C and to bacteriocin, of pathogenic and non-pathogenic strains of *Agrobacterium radiobacter*. *Physiol. Plant Pathol.* **4**, 81-91.
17. Rogers, S. G., et al. (1986) *Meth. Enzymol.* **118**, 627.
18. Vernarde, D., A. Herrera-Estrella, K. Wang, and M. V. Montagu (1988) Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens vir* genes by acetosyringone at low pH. *J. Bacteriol.* **170**, 5822-5829.
19. Hayman, G. T. and S. K. Farrand (1990) *Agrobacterium* plasmids encode structurally and functionally different loci for catabolism of agocinopine-type opines. *Mol. Gen. Genet.* **223**, 465-4783.

---

**Transformation of *Populus tremuloides* Using *Agrobacterium rhizogenes***

Key Zung Riu<sup>1\*</sup>, In Sup So<sup>1</sup>, Zang Kual U<sup>1</sup>, Young Hwan Ko<sup>1</sup>, Sunjoo Lee<sup>1</sup> and Wesley P. Hackett<sup>2</sup> (<sup>1</sup>*Applied Radioisotope Research Institute, Cheju National University,* <sup>2</sup>*Department of Horticultural Science, University of Minnesota, USA*)

**Abstract**: Several factors affecting on transformation efficiency were studied to establish a *Agrobacterium rhizogenes* mediated system for the transformation of *Populus* species, and We could obtaine tansgenic plantlets expressing the introduced gene. Leaf sections were more sensitive than stem sections to kanamycin and thought to be better material for transformant screening. The bacterial density did not affect on the efficiency of transformation over the range of  $4 \times 10^5 \sim 7 \times 10^9$  cfu. The optimum period for co-cultivation was one day or shorter. Both of the optimum concentrations of cefotaxime and ampicillin in the medium were 250  $\mu\text{g/ml}$  for elimination of bacteria from the inoculated leaf sections. The addition of acetosyringone in the bacterial culture medium increased transformation rate, and the highest rate was obtained at 50  $\mu\text{M}$  of acetosyringone. The transformed galls could be selectively induced and grown on the growth regulator-free medium or on the medium containing 100  $\mu\text{g/ml}$  or higher contraction of kanamycin. The roots were induced from the galls incited by *A. rhizogenes* within 3 weeks on the growth regulator-free medium as well as on the medium containing growth regulators. The plantlets were regenerated from the galls cultured for 6 weeks on the medium containing 0.05  $\text{mg/ml}$  of NAA and 0.5  $\text{mg/ml}$  of BA. The expressions of the introduced opine gene in the transformed galls and plantlets were confirmed by the analysis of agropine and mannopine.

---

\*Corresponding author