

植物의 癌腫誘發에 관한 研究 (第 2 報)

野外條件에서 도마도 줄기에 誘發된 癌腫組織의 Peroxidase Activity 에 대하여

李 敏 載 · 洪 淳 佑 · 崔 榮 吉

(서울대학교 文理科大學 植物學科)

Studies of Plant Tumor Induction (Part 2)

On the Study of Peroxidase Activities of Tumor
Tissues Developed on Tomato Stem in Outdoor Conditions.

Lee, Min Jai., Hnong, Soon Woo, and Choi, Yong Keel

(Dept. of Botany, Seoul National University)

Abstract

The relationships between tumor score and peroxidase activities of tomato stems infected with *Agrobacterium tumefaciens* strain A6K1, B6, T37, 11BNV6, 11BV7 and wounded stem as a control were examined in relation to crown gall tumor development on purpose to study the lignification of tumor tissue which is affected to the development of crown gall tumor.

As the previous paper has been mentioned the fact that the induction of tumor tissues were inhibited or limited in the lignified stem of host plant.

It was presumed that the activities of peroxidase related to the development of lignification were decreased during the period of tumor development. But the experimental result in this experiment shows that the peroxidase activities of crown gall tumor tissues infected with the *A. tumefaciens* strains which are already known as virulent are increasing during four weeks, however, in the strain 11BNV6 and wound the peroxidase activities are decreasing on the second week after the inoculation of the bacteria strains.

These results could be explained on the basis of that possible regulatory agents of lignification which were accumulated in tumor tissues, IAA, ascorbic acid, glutathion(GSH) and caffeic acid esters, were postulated to act as antioxidants which has been suggested by Stafford.

Total nitrogen contents in relation to crown gall tumor development were determined for the detection of protein synthesis related to the enzyme activities which are increasing in the time of plant growth. Generally six groups are contained the largest amount of nitrogen on the second week after the inoculation of the bacterium.

Comparing to the tumor score, it is presumed that the all of enzyme activities including peroxidase in tumor tissues are increasing from the second week through the third week after the inoculation of bacterium and the protein synthesis is stimulated under the most appropriated temperature during the above periods.

緒 論

著者들은 *Agrobacterium tumefaciens* 의 다섯 strain

에 대한 癌腫誘發能力과 癌腫誘發現象에 대한 傾向
性을 前報에서 報告한 바있다. 特히 自然狀態에 있
어서 土壤細菌의 1種인 *A. tumefaciens* 에 依하여 誘

發되는 植物의 癌腫은 그 宿主植物의 木質化程度가 深한 것일수록 癌腫組織이 誘發되지 못하거나 生長 過程中에 스스로 衰退하여 버리는 現象을 觀察할 수 있었다. 上記의 現象은 著者들에게 植物의 癌腫誘發 및 發達이 植物의 木質化 現象과 깊은 關係가 있을 것이라는 疑問을 던져 주었다. 卽 植物體의 木質化 現象을 主導하는 어떠한 酵素의 activity가 癌腫誘發이 旺盛하게 促進되는 時期에서는 그에 比例하여 減少되는 것이 아닌가 하는 疑問을 갖게 되었는데 現在까지 *A. tumefaciens*에 依하여 誘發되는 植物의 癌腫組織誘發과 木質化 現象과의 關係에 對한 報文은 全無한 狀態에 있다.

그러나 正常의 植物을 材料로한 여러가지 實驗報告에 依하면 植物細胞의 第 2次細胞膜 成分으로 lignin이 形成됨에에 IAA-oxidase system 中の peroxidase가 eugenol類의 芳香性 單分子들의 polymerization 反應에 直接 참여한다는 報告(Siegel, 1953, 1954, 1955, Lipetz, 1965)가 있는 것으로 보아 癌腫組織內의 peroxidase의 activity를 測定하여 上記와 같은 疑問點을 究明하려 하였다.

따라서 著者들은 tumor score와 peroxidase의 activity를 測定하여 그 相對性을 檢討하므로써 *A. tumefaciens*에 依하여 誘發되는 癌腫組織의 發達度와 木質化 現象과의 相互關連性을 밝히려 하였으며 아울러 癌腫誘發過程에 따른 몇가지 要因도 究明코

자 本實驗을 試圖하였다.

材料 및 方法

菌種 : *Agrobacterium tumefaciens* strain A6K1, B6, T37, 11BNV6, 11BV7을 dextrose agar nutrient의 slant에서 培養시켰다.

宿主植物과 bacteria의 接種 : 興農種苗株式會社로부터 耐病性이 強한 第一代交配 “興農大王도마도” 種子를 購入하여 播種한후 84日 生長한 도마도 줄기의 第2, 第3 莖節間部位에 直徑 3mm의 크기로서 傷處를 내어준후, 24時間 培養된 *A. tumefaciens* strain 各名을 5 loop씩 phosphate buffer 5cc(pH 5.0)에 稀釋하여 5種의 strain을 0.1cc씩 傷處部位에 注入한後에 glycerin으로 封했다.

그리고 傷處만 내어주고 bacteria를 感染시키지 않은 도마도 줄기를 control로서 定했다. (Lee, Hong and Choi 1966).

Tumor score: Lipetz(1965)가 使用한 癌腫組織의 크기를 表示하는 單位를 導入하여 4週間 測定했다. 卽, 人爲의으로만든 傷處部位에 形成層을 形成하지 못하는 것을 score 0으로, 分裂하지 못하는 形成層이 誘發된것을 0.5, 限定된 分裂을 하는 것을 1.0, 도마도줄기의 傷處部位가 없어지기 前의 狀態를 1.5, 完全한 crown-gall tumor를 形成한것을 2.0으로 記錄했다.

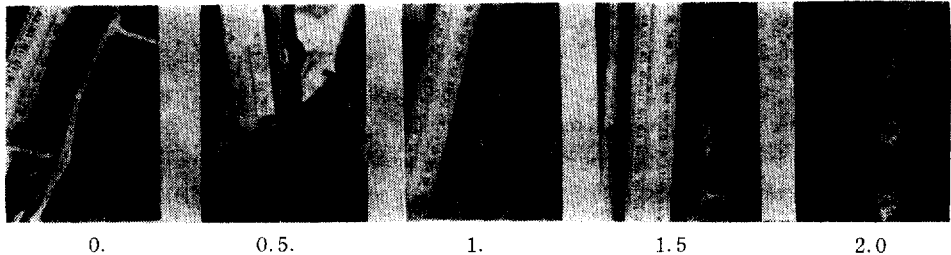


Fig. 1. Standards for scoring tumors of tomato stem. Tumor scores described in Table 1 and Fig. 2 were obtained by comparing tumors to these photographs. Numbers refer to tumor score.

Peroxidase activity 測定 : 本實驗은 菌種接種後 一週間隔으로 材料를 採取하여 역시 4週동안 測定하였다. 各 材料는 實驗 1日前에 1,000PPM. 濃度의 chloramphenicol(succinate free) 0.1cc를 各 傷處部位에 注射處理하여 bacteria-free 한 狀態를 만든 癌腫中心部位를 1gr. 採取하였다(Lee, Hong and Choi 1966 unpublished).

이것을 0°C 以下의 狀態에서 1/15M acetic acid

buffer(pH 5.0) 10cc를 加하여 充分히 磨碎한다음 蒸溜水 16cc를 加하여 3,000R.P.M/15Min/-5°C로서 遠心分離하였다.

그의 上澄液을 取하여 0.1% 水溶性 guaiacol 1cc, 0.01% H₂O₂ 1cc를 넣어서 30°C에서 15分間 反應을 시킨다음 1N H₂SO₄ 2cc를 添加하여 反應을 中止시키고 5分以內에 Engelhalt 溶液으로 比色定量했다. (Guaiacol method¹¹)

上記의 條件下에서 peroxidase는 guaiacol과 H₂O₂와의 反應에서 觸媒作用을 하여 反應產物인 tetraguaiacol을 生成하는데 이 生成된 tetraguaiacol의 mg %를 fresh weight 1gr 當 peroxidase의 activity로서 定했다.

Total nitrogen 測定: 週別로 癌腫部位를 分離하여 Semimicro Kjeldahl 含窒素 定量法으로서 dry weight mg 當 窒素의 含量을 測定했다.

結果 및 考察

一般的으로 植物의 癌腫 形成 및 그 發達度(크기로 表示했음)에 미치는 要因으로서는 다음 4가지로 크게 나누어 列擧할 수 있다. 即 傷處의 크기, 感染 bacteria의 數, 溫度, 및 高度의 濕度에 크게 左右 된다고 하는데(Braun, 1947., Riker et al 1950, 1962) 同實驗期間中의 서울地方의 最高 最低平均氣溫(Table 2)이 癌腫組織의 誘發에 미치는 影響을 考慮하여 Table 1 및 이를 根據로한 Fig. 2.를 檢討하

면 bacteria 感染後 第2週까지는 大體로 癌腫誘發이 不振하다가 virulent한 bacteria strain에 感染된 줄기의 境遇 急激한 癌腫組織의 誘發을 보여 주었고 strain 11BNV6에 感染된 도마도줄기는 control보다도 낮은 tumor score 0을 記錄한 事實은 特異한 一例였다.

Table 1. Tumor scores of tomato stem infected with various *A. tumefaciens* strains.

A.t strain	Week			
	1st.	2nd.	3rd.	4th.
A6K1	0.5	0.5	1.5	2.0
B6	0.5	0.5	1.5	2.0
T37	0.5	0.5	1.0	2.0
11BNV6	0	0	0	0
11BV7	0.5	1.0	1.5	2.0
Wound	0	0.5	0.5	0.5

中央觀象臺發表의 同實驗期間中 1日最高, 最低

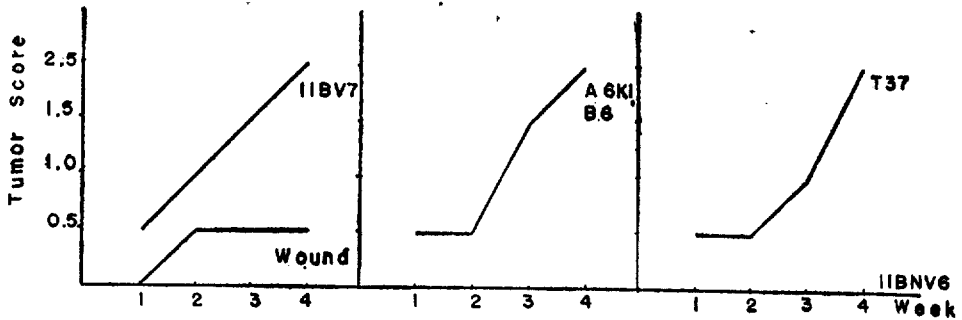


Fig. 2. The comparison of tumor score of tomato stem infected with various *A. tumefaciens* strains in relation to the period of week.

氣溫平均을 (Table. 2) 上記의 tumor score와 比較하면 bacteria 感染後 週別 最高氣溫平均은 31°C, 25.3°C, 25°C, 23.2°C였으며 最低氣溫平均으로서는 23.4°C, 19.5°C, 18.4°C, 16.2°C였는데 第2週末까지 癌腫誘發이 不振한 理由로서는 第1週의 最高平均氣溫이 31°C라는 高溫에 基因하는 것으로 보인다. 도마도의 癌腫誘發에 對한 最適溫度로서는 26°C內外로서 報告(Riker et al, 1962) 되어있고 30°C以上에서는 癌腫組織이 誘發되지 못하거나, 形成이 되었다고 하여도 작은크기의 癌腫組織이 形成된다고 하는데 이러한 事實은 1920年代에(Riker, 1926) 行한 同一한 材料의 實驗에서 bacteria-free한 組織을 目的으로 31°C에서 數日동안 incubation 해

준 結果 bacteria가 致死했다는 報告로서 立證된바 있다.(Braun, 1947). 그러므로 Fig. 2에서 보여준 바와 같은, 第2週末까지 癌腫誘發이 늦어진 現象도 위와같은 高溫下에서 植物體에 感染시킨 bacteria가 致死에까지는 이르지않았으나 그의 生活力이 매우 抑制된 狀態에 있다가 第2週以後 最適氣溫에 가까워 짐에따라 急激히 癌腫組織의 誘發을 보여준 것으로 생각되며, 한편 週別 最低氣溫이 23.4°C, 19.5°C, 18.4°C, 16.2°C인 동안의 影響을 考察하면 上記의 溫度에서 *A. t* bacteria가 inactivation 되었다는 報告가 없는 것으로 보아 癌腫誘發過程에 별 다른 影響을 주지 않는 것으로 判斷했다. 特히 strain 11BNV6의 境遇는 avirulent한 strain이 었다

는點과 31°C 高氣溫下에서 致死해 버린것으로 解釋된다.

Table 2. Records of the highest and lowest temperature of Seoul area in a day from 23th of August through 20th of September, in 1966 authorized by Central Meteorological Office of Korea.

Week	Day							Average Temp. C°	
	1	2	3	4	5	6	7		
1st	H	31	30	29	31	32	31	33	31
	L	23	24	25	24	23	23	22	
2nd	H	33	32	28	19	20	26	19	25.3
	L	23	25	19	17	18	18	17	
3rd	H	22	23	27	28	26	23	26	25
	L	17	20	21	19	18	17	17	
4th	H	24	22	22	25	20	25	25	23.2
	L	15	12	20	20	14	20	13	

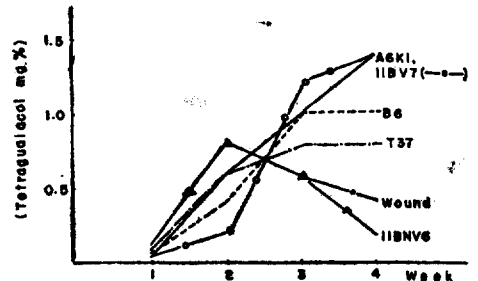
癌腫組織 및 傷處部位에 存在하는 peroxidase의 activity를 tetraguaiacol mg %로서 나타낸 Table 3. 및 Fig. 3의 結果를 보면 control과 strain 11BNV6에 感染된 줄기는 感染後 2週末에서 最大의 activity를 보여 주다가 以後 떨어지는 傾向을 보여 주고, virulent한 bacteria strain에 感染된 도마도 줄기는 계속 peroxidase의 activity가 上昇해가는 現象을 나타냈다. 이러한 現象은 26°C 固定의 growth chamber內에서 行한 同一한 材料의 實驗에서 (Riker et al, 1962, 1965), ascorbic acid oxidase 및 tyrosinase의 activity를 測定한 結果 wound에서는 16日 以後부터 下落했으며 virulent한 bacteria strain에 感染된 도

Table 3. Tetraguaiacol mg % which is represented the peroxidase activities per gr. of fresh weight of tumor tissues infected with the various strains of *A. tumefaciens* and wounded stem as a control (Average of 2 replicates).

A.t. Strain	Week			
	1st	2nd	3rd	4th
A6K1	0.034	0.61	1.01	1.42
B6	0.05	0.41	1.01	1.01
T37	0.05	0.61	0.81	0.81
11BNV6	0.01	0.81	0.61	0.20
11BV7	0.034	0.20	1.22	1.42
Wound	0.11	0.81	0.61	0.41

마도 줄기에서 相當期 동안 酵素의 activity가 上昇을 계속했다는 報文과 類似한 傾向을 나타내었는데 一般的으로 癌腫組織의 크기와 이에 比例하여 모든 酵素의 activity가 높아진다는 同論文의 結論과 Fig. 2, 3에 나타난 結果는 一致함을 보여 준다.

Fig. 3. Graph is showing the peroxidase activities of tumor tissues developed on tomato stem infected with the various *A. tumefaciens* strains. The peroxidase activities were measured every week by guaiacol method. (Average of 2 replicates)



그런데 모든 植物이 生長期日이 길어질수록 그의 줄기가 堅固히 木質化함에 비추어 木質化에 關與하는 酵素인 peroxidase의 activity가 계속 分裂生長해가는 癌腫組織에서는 점차로 낮아질것이 豫見되었으나 Fig. 3.에서 보는바와 같이 virulent한 bacteria strain에 감염된 癌腫組織의 peroxidase가 계속 上昇해 가며, 宿主植物의 줄기가 계속 木質化됨에는 關係없이 癌腫誘發이 促進되는 現象은 下記의 여러가지 實驗的 結論으로서 解釋되고 있다. 即 正常細胞에서는 植物의 生長促進 hormone인 indole-3-acetic acid (IAA)를 分解하는 能力이 強한反面 癌腫細胞에서는 IAA를 分解하는 能力이 弱하여 癌腫組織에 多量의 IAA의 蓄積이 이루어 지게된다 (Lipetz, 1959., Braun 1958., Galston, 1960) *Parthenocissus tricuspidata*를 材料로한 IAA oxidase와 peroxidase의 activity를 測定한 實驗에서도 그러한 結果가 立證되었으며 木質化現像의 最終段階에서 regulatory agent로서 ascorbic acid, glutathion (GS H) 및 IAA가 主로 作用한다고 한다. (Stafford, 1965) 또 木質化現像의 最初段階에서도 caffeic acid ester와 함께 IAA의 含量에 따라서 木質化가 左右된다는 報文이 있다. excised tissue를 材料로한 實驗에서 10⁻⁴ mole 程度의 IAA가 包含되어 있을때 木質化가 이루어지지 않았다고 하는데 (Stafford, 1965)

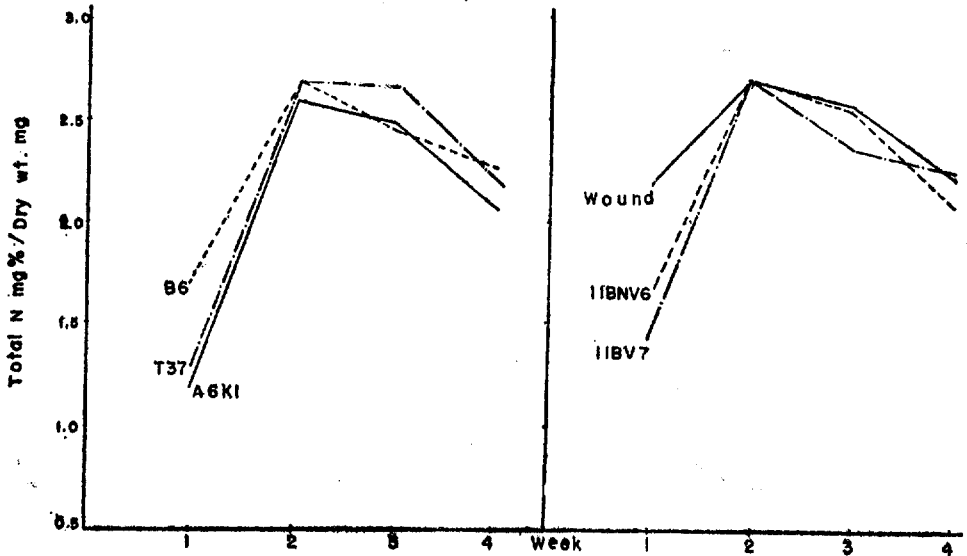


Fig. 4. Graph shows the relationship between the nitrogen contents of tumor tissues and the weekly periods after the inoculation of *A. tumefaciens* strain. Total nitrogen contents were measured by Semimicro Kjeldahl method. (Average of 2 replicates)

生長이 活潑한 shoot apex 및 root tip에 peroxidase의 activity가 매우높은것도 事實이나 本質化가 쉽사리 이루어지지 않는 理由로서는 여러가지 regulatory agent 即, ascorbic acid, glutathion, caffeic acid ester 및 高濃度의 IAA가 蓄積되어 antioxidants

의 作用을 하기 때문이며, 癌腫組織에도 Fig. 3와 같이 virulent한 bacteria strain에 感染된 도마도 줄기에서 peroxidase의 activity가 上昇함에도 急激한 癌腫誘發을 보여준 事實 또한 同一한 機作으로 믿어진다.

Table 4. Total nitrogen contents of tumor tissues developed on tomato stem. The units of nitrogen contents are mg % per dry weight of tumor tissues. (Average of 2 replicates)

A.t. Strain	Week			
	1st	2nd	3rd	4th
A6K1	1.24	2.68	2.49	2.12
B6	1.70	2.75	2.47	2.29
T37	1.31	2.75	2.52	2.19
11BNV6	1.70	2.74	2.59	2.10
11BV7	1.40	2.74	2.38	2.28
Wound.	2.21	2.73	2.63	2.26

Table 4. 및 Fig. 4는 癌腫組織 및 傷處 部位를 切斷해낸후 그의 乾燥量 mg當%의 窒素의 含量을 나타낸것으로서 大體로 近似한 傾向을 보여주었다. 모든 實驗群이 第2週末까지 最大의 窒素含量을 나타내다가 2週以後 下落하는 傾向을 보여주는데 感染시킨후 16日까지 測定한 報文 (Riker et al, 1962) 과도 類似한 結果였다. Fig. 2와 比較檢討하면 最適氣溫下에서 第2週부터 急激히 癌腫組織을 形成해 갈때 生長에 必要로하는 protein의 合成量도 增加하는 것으로 보여지는데 이로서 미루어 보건대 virulent한 bacteria strain에 感染된 도마도 줄기에서 誘發된 癌腫組織內的 모든 酵素의 activity는 peroxidase를 포함하여 相當期日동안 上昇하는 것이 아닌가 類推된다.

摘 要

Agrobacterium tumefaciens strain A6K1, B6, T37 11BNV6, 11BV7를 도마도줄기의 第2, 第3 莖節間部位에 感染시켜 癌腫을 誘發시킨 結果는 다음과 같이 要約할수 있다.

(1) Virulent 한 bacteria strain 에 感染된 줄기일수록 high tumor score 를 보여 주었으며 avirulent 한 strain 11BNV6 의 境遇 tumor score 0 을 記錄했다.

(2) 一般으로 第一週 平均最高氣溫이 31°C 인 期間에는 癌腫組織의 誘發이 不振했으며 第2 週末以後 最適氣溫에 가까운 狀態에서 急激한 癌腫組織의 形成을 나타냈다.

(3) 木質化現像에 關與하는 酵素인 peroxidase activity 는 virulent 한 strain 에 感染된 癌腫 組織에서 大部分 相當期日동안 上昇해가는 傾向을 나타내었고 control 인 傷處와 11BNV6 의 境遇는 계속 下落해감을 보여주었다.

(4) Peroxidase 의 activity 가 virulent 한 bacteria 에 感染된 癌腫組織에서 높아짐에 反하여 癌腫誘發이 促進되는 理由는 indole-3-acetic acid (IAA) 의 蓄積에 因인 것으로 論議된다.

(5) 癌腫組織에서의 含窒素量은 全般的으로 第2 週末에서 第3 週까지 最大의 含量이 維持된 것은 癌腫組織形成에 必要로하는 蛋白質의 合成이 가장 必要로하는 時期인 것으로 보여지며 癌腫細胞內의 모든 酵素의 activity 가 peroxidase 를 포함해서 一般的으로 높아지는 것으로 判斷된다.

References

- 1) 植物榮養學實驗編集委員會. 1959 植物榮養學實驗. 朝倉書店. pp. 197—199.
- 2) BRAUN, A.C. 1947. Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall.¹ Am. J. Botany **34** : 234—240.
- 3) BRAUN, A.C. 1958. Morphology and physiology of plant tumors. Protoplasmatologia × (5a) 1—93.
- 4) GALSTON, A.W. 1960. The mechanism of action of auxin. Ann. Rev. Plant Physiol. **11** : 239—276.
- 5) LEE, M.J., HONG, S.W. and CHOI, Y.K. 1966. Studies of plant tumor induction. (I.) Experiments on the inoculation of *A. tumefaciens* Kor. Jour. Microbiol. **4** No. 2.
- 6) LIPETZ, J. 1959. A possible role of indole acetic acid oxidase in crown gall tumor induction. Nature **184** pp. 1076—1077.
- 7) LIPETZ, J., GALSTON, A.W. 1959. Indole acetic acid oxidase and peroxidase activities in normal and crown gall tissue cultures of *Parthenocissus tricuspidata*¹. Am. J. Botany **46** : 193—196.
- 8) LIPETZ, J. 1965. Mineral elements and differentiation in plant tissue cultures. Proceedings of an International Conference on Plant Tissue Culture. 69—76.
- 9) LIPETZ, J. 1965. Crown-gall tumorigenesis: Effect of temperature on wound healing and conditioning. Science **149** : 865—867.
- 10) RIKER, A.J., ALLEN, O.N. and THEIS, T.N. 1950.
The destruction of crown-gall bacteria in periwinkle by high temperature with high humidity. Am. J. Botany **37** : 792—801.
- 11) RIKER, A.J., HILDEBRAUDT, A.C. and SPURR, H.W. 1962. Ascorbic acid oxidase and tyrosinase activities in relation to crown-gall development. Phytopathology **52**, No. 10, 1079—1086.
- 12) RIKER, A.J., HILDEBRAUDT, A.C. and SPURR, H.W. 1965. The integral association of chlorogenic acid to crown gall tumor formation. Phytopathology **55** : 1004—1008.
- 13) SIEGEL, S.M. 1953. On the biosynthesis of lignin. Physiol. Plant. **6** : 134—139.
- 14) SIEGEL, S.M. 1954. Studies on the biosynthesis of lignins. Physiol. Plant. **7** : 41—50.
- 15) SIEGEL, S.M. 1955. The biochemistry of lignin formation. Physiol. Plant. **8** : 20—32.
- 16) STAFFORD, H.A. 1965. Factors controlling the synthesis of natural and induced lignins in phleum and elodea ^{1,2}. Plant Physiol. **40** : 884—851.