

***Agrobacterium rhizogenes*에 의한 Hairy Root 형성에 대한 생리학적 연구**

I. *A. rhizogenes*에 감염된 당근 조직에서의 IAA 함량과 형태적인 특징과의 관계

黃 裊·趙 德 以*·洪 性 式**

(全南大學校 生物學科, *全州 又石大學 生物學科, **全南大學校 生物教育學科)

Physiological Studies on the Formation of Hairy Root by the *Agrobacterium rhizogenes*

I. Relationships between IAA content and morphological characteristics in carrot infected by *A. rhizogenes*

Hwang, Baik, Duck-Yee Cho* and Sung Sik Hong**

(Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju,

*Department of Biology, Jeonju Woo Suk University and

**Department of Biology Education, Chonnam National University, Kwangju)

ABSTRACT

Inoculation of carrot discs with *Agrobacterium rhizogenes* harboring Ri plasmid resulted in transformation of cells, as revealed by the tumors and hairy roots arising from them. Measurements of IAA content using HPLC indicate that it is higher in tumors and inoculated tissues than in uninoculated tissue. A lot of meristemoids and vessel elements formed in tumor tissue and the hairy roots differentiated from meristemoids. IAA content in tumor tissues is decreased with hairy root and vessel elements formation from them. Formation of wound callus in uninoculated tissues resulted on wound healing but no formation of vessel elements and hairy roots. Tumor tissues show continuous growing on hormone free medium.

서 론

Elliot(1951)에 의해 *A. rhizogenes*가 식물에 있어서 hairy root를 유발시키는 것이 알려진 이래 이와같은 *A. rhizogenes*가 root inducing(Ri) plasmid를 가지고 있고(Moore *et al.*, 1979; White and Nester, 1980)이의 DNA 절편이 숙주식물 genome에 들어가 감염부위에

본 연구는 1985년도 문교부 학술연구조성기 지원에 의한 것임.

tumor 및 hairy root의 형성을 유도하는 것이 알려졌으나(Chilton *et al.*, 1982; White, 1982) 아직 그 자세한 기작은 *A. tumefaciens*에 비해 덜 알려져 있다. *A. tumefaciens*에 의해 숙주식물 세포로 들어가는 T-DNA는 숙주식물내에서 오옥신의 형성(Inze, *et al.*, 1984; Kemper *et al.*, 1985; Thomashow *et al.*, 1986; Weiler and Spanier, 1981) 및 cytokinin의 합성(Akiyoshi *et al.*, 1983)에 관계하는 효소를 encode하여 tumor cell에서의 오옥신 및 cytokinin양이 증가하게 되어(Amasino and Miller, 1982) hormone free배지에서 이들 tumor 조직들이 계속 성장할 수 있는 auxin autotrophy (Atsumi and Hayashi, 1978; Pengelly and Meins, 1982)가 된다고 하였다.

본 실험에서는 *A. rhizogenes*를 당근조직에 처리하여 이에 감염된 조직에서의 tumor 형성과 이에 따른 hairy root의 형성에 대한 생리학적 연구를 위한 첫단계로 이와같은 tumor 및 hairy root의 형성은 위에서 언급한 endogeneous hormone의 양적인 변화에 기인한다고 생각하여 IAA양의 경시적인 변화와 이에 따르는 형태적인 변이를 보았는데 이와같은 과정에서의 형태적인 변화의 고찰은 처음으로 시도되는 것이며 이 tumor 조직을 hormone free 배지에 배양하여 phytohormone autotrophy의 확인도 하였다.

실험 재료 및 방법

Bacterial strains. *A. rhizogenes* Strain A₄(agropine type)은 나고야대학의 C. Matsui 교수로부터 분양받은 것을 Potato extract배지(20g/l sucrose)에 배양하여 사용하였다(Petit *et al.*, 1983).

Inoculation. 당근 뿌리조직을 표면 살균하여 2~3cm 두께로 잘라 약 0.5ml의 bacterial suspension (10⁸ bacterial/ml)을 각각의 뿌리절편에 처리하여 27°C (dark)로 배양하였다.

Auxin assay. 균처리구와 대조구의 형성층 부위를 중심으로 시료를 채취하여 15 ml의 ethanol에서 추출한 후 이 ethanol 분획을 감압건조시켜 증류수로 용해시킨 후 C-18-SEP-PAK으로 통과시켜 정제하였다. 정제된 IAA 용액중 20 μ l를 HPLC (Waters Co. Ltd., Model 440)에 주입, 정량하였다. Column은 μ -Bondapak C₁₈-Octadecylsian (ϕ 3.9mm \times 30cm, Waters Co.)를 사용하였고 이동상으로는 85% H₃PO₄용액에 0.05 M KH₂PO₄ (pH 2.1)가 첨가된 완충액을 5분간 압력 1,400psi, 유속 1.0 ml min⁻¹으로 흘려보낸 후 0.05 M KH₂PO₄+K₂HPO₄ (pH6.8) 완충액을 15분간, 압력 1,400 psi, 유속 1.0 ml min⁻¹으로 흘려보내 형광검출기로 285 nm에서 여기시켜 365 nm의 형광을 측정하였고 이때 retention time은 17분 30초였다.

Morphological observation. 균처리구와 대조구에서 정시적으로 채취한 시료를 FAA에 고정한 후 Butanol series(30%—absolute)로 탈수하여 paraplast에 포매한 후 횡단 및 종단면의 연속적인 절편을 채취, Hematoxylin-Safranin에 염색하여 관찰하였다.

Tumor tissue의 배양. 위에서 형성된 tumor 조직을 항생제 (Carbenicillin 400 μ g/ml + Vancomycin 100 μ g/ml)에 처리하여 무균수에 세척한 후 hormone free MS 배지에 배양하였다.

결 과

IAA content and distribution. Fig. 1은 균처리한 실험구와 대조구에서의 IAA 함량을 정

시적으로 측정된 것으로 균처리구에서는 형성층 부위의 세포 분열이 활발한 배양 5일 경부터 IAA 함량이 증가하기 시작하여 배양 9일경에는 보다더 증가하고 13일경에는 가장 많이 증가하여 대조구에서 보다 1.7배 증가하는 것을 보여주고 그 후에는 감소되는 경향을 보이고 있다.

한편 대조구는 배양 9일경까지 IAA 함량이 약간 증가하다가 배양 13일경에 최고로 되었다가 이후부터 감소되기 시작하여 21일 후 부터는 균처리구와 거의 비슷한 수준을 나타내고 있었다. 균처리구에서는 배양 5일 경부터 형성층부위에서 세포분열이 활발하게 일어나고 이때부터 이 부위에 tumor가 생기기 시작하여 9일 정도되면 meristemoid들이 많이 형성된 tumor들을 볼 수 있고 (Fig. 2) 배양 11~13일경부터 이러한 조직들로 부터 hairy root의 분화가 시작된 후 1주일 정도 많은 hairy root의 분화가 계속되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 그러나 균 처리한 실험구에서 배양 13일째까지 합성된 IAA량은 측정치보다 훨씬 높았으리라 생각되고 증가된 IAA는 세포분열, meristemoid형성 및 속내형성층의 통도요소로의 분화등에 소모되었으리라 생각되어 졌고 배양 13일 이후 IAA량의 감소는 hairy root의 분화와 성장, 속간형성층의 통도요소등의 분화에 IAA가 소모되었기 때문으로 사료되었다. 이와 같은 결과는 *A. tumefaciens*에 의해 형성된 Callus에서 대조구에서 보다 10~30배의 cytokinin, IAA의 함량이 높았던 것과는(Amasino and Miller, 1982; Atsumi and Hayashi, 1978) 훨씬 낮은 양의 IAA가 측정되었지만 그 양상은 일치하는 것으로 나타나 *A. tumefaciens*의 T-DNA가 auxin 및 cytokinin 합성에 관여하는 유전자를 coding하는 것(Akiyoshi *et al.*, 1983; Inze *et al.*, 1984; Kemper *et al.*, 1985; Thomashow *et al.*, 1986; Weiler and Spanier; 1981)과 같이 *A. rhizogenes*의 T-DNA에 의해 형질전환된 식물 조직에서도 같은 현상이 야기되는 것으로 추측 되어졌다. 한편 균처리 13일 이후부터 IAA 함량의 급격한 감소와 이때부터 hairy root의 분화가 일어나는 것에는 상관관계가 있는 것

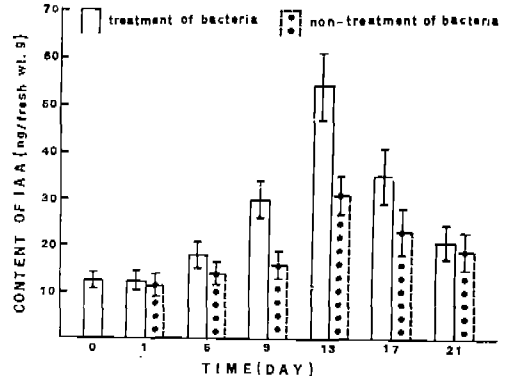


Fig. 1. IAA contents in carrot tissue treated with (□) and without (·) *Agrobacterium rhizogenes*.

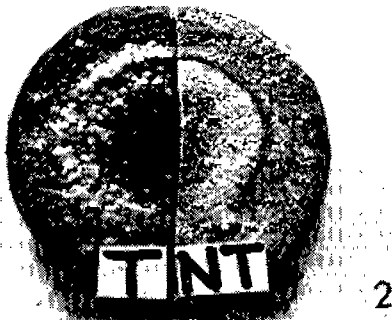


Fig. 2. Induced tumor tissues and wound callus on carrot discs treated with (T) and without (NT) bacteria after 9 days (xl).

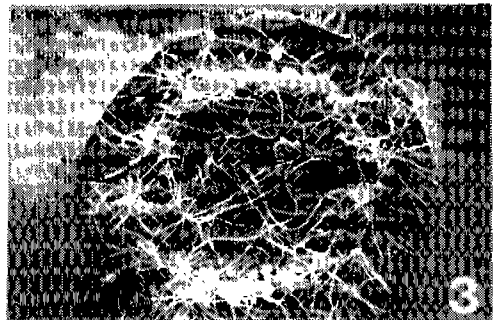


Fig. 3. Vigorous growth of hairy root from the tumor tissues after 17 days (xl).



Figs. 4-10. Photographs showing tumors, meristemoids and hairy roots formed on carrot discs treated with *Agrobacterium*.

Fig. 4. Radial section showing tumor induction from explant after 3 days of culture. **Fig. 5.** Active transverse divisions of cambial region after 5 days of culture. **Fig. 6.** Meristemoids differentiated from cambial region and neighbouring parenchyma cells within ground tissue below tumors after 7 days of culture. **Fig. 7.** Radial section of tumor formed on explant after 9 days of culture. **Fig. 8.** Cross section of vascular bundle below tumor formed on explant. Arrow indicates tracheary elements differentiated directly from intrafascicular vascular cambium. **Fig. 9.** Hairy root differentiating from meristemoid formed within tumor after 11 days culture. **Fig. 10.** Longitudinal section of tumor with hairy roots after 23 days of culture. (C: cambium, M: meristemoid, HR: hairy root, TE: tracheary element) (Scale: Fig. 4, 5, 6=50 μ m, 7, 9, 10=100 μ m, 8=30 μ m)

으로 보여졌는데 이러한 결과는 *Chrysanthemum*에서 부정근이 형성되는 동안의 줄기 절단면에서의 내재 auxin 함량을 측정 한 결과 (Weigel *et al.*, 1984)와 포도나무에서 줄기를 절단, 뿌리가 분화내지 성장할 때의 경시적인 auxin양의 증감의 결과(Nakano *et al.*, 1980)와도 일치하였다.

특히 Odom과 Carpenter(1965)는 내재 auxin이 중요한 rooting factor의 하나라고 하여 auxin activity가 높을 때 발근율도 높아진다고 하였고 이후부터는 뿌리가 성장함에 따라 점차 내재 오옥신의 양이 감소한다고 하여 (Wheller, 1971), tumor 조직에서 hairy root로의 분화, 성장과정에 이와같이 합성된 IAA가 이용되어졌으리라 사료되었다.

형태적 관찰. 균처리 후 3일경부터 형성층 부위를 중심으로 유조직 세포들의 분열에 의한 tumor 조직들이 유도되기 시작하여(Fig. 4) 5일경에는 절단 표면 전반에 비교적 크고 액포화된 동질적인 2~3층의 tumor 세포층이 형성되고 특히 형성층 부위에서는 세포분열이 활발하게 일어나고 있는것을 확인할 수 있었다. 이 부위를 방사단면으로 보면 비교적 크고 액포화된 2~4층의 tumor세포 아래에는 형성층과 형성층 유도체들의 거듭된 횡분열에 의하여 크기가 작고 세포질이 소밀한 세포들이 비교적 규칙적인 열을 형성하고 있다(Fig. 5). 배양 7일 경에는 형성층 부위와 이에 인접한 사부와 목부유세포들에서 기원된 크기가 작고 세포질이 조밀한 meristemoid들이 형성되기 시작하여(Fig. 6) 9일경에는 육안으로 식별되는 tumor가 형성된다. 이 tumor 표면은 크고 액포화된 세포들로 되어 있지만 심부 또는 주변부에는 작고 세포질이 조밀한 세포들로 구성된 meristemoid들이 많이 형성되어 있고(Fig. 7) 이 meristemoid와 기본 조직 사이에는 부정형의 작은 통도요소들이 분화되어 이들을 연결시켜 주고 있다(Fig. 8).

배양 11~13 일경에는 tumor의 지속적인 성장 및 meristemoid로부터 hairy root가 분화되기 시작하여(Fig. 9) 지속적인 성장을 하지만 배양 21~23일 경에는 거의 정지되는 것을 보여주고 이때 tumor내에는 많은 통도 요소들이 분화되어 기본조직 또는 인접 hairy root들과 연결되어 있는것을 확인할 수 있었다(Fig. 10). 한편 대조구에서는 배양 3일경에 형성층 부위와 유조직 세포들로부터 callus가 유도되기 시작하여 9일경까지 8~9층의 동질적인 callus 세포층이 형성된다(Fig. 11). 배양 10일 이후 부터 형성층 부위에 tumor 모양의 callus가 형성되지만 이것은 wound callus로 (Kahl, 1982) meristemoid나 hairy root는 형성되지 않는다. 배양 23일까지도 이와같은 분화는 없고 부정형의 통도요소들이 드물게 관찰될 뿐이었다(Fig. 12). 균처리한 조직에서의 meristemoid의 형성 및 통도 요소들의 분화가 대조구에 비해 월등히 많이 이루어지는 것은 합성되는 내재 IAA의 양의 차이에 의하여 일어나는 것으로 생각되어졌는데 이는 *Phaseolus* (Roberts and Baba, 1970), *Coleus* (Fosket, 1970), *Pea* (Sachs, 1973) 등의 줄기절편 및 유세포로부터의 통도 요소들의 분화에 IAA가 관련된다는 보고와 일치하였다.

Tumor조직의 배양. Fig. 13은 균처리에 의하여 유도된 tumor조직을 hormone free 배지에 약 30일 배양한 것이며 Fig. 14는 이에서 계속 유도, 성장되는 hairy root로 이들 tumor 조직들이 phytohormone에 autotroph한 것을 보여주고 있다. 이것은 Ti plasmid의 T-DNA에는 식물세포에서 IAA를 비정상적으로 많이 만들어내는 기능을 갖는 gene (iaap)을 가지고 있어 일단 IAA production gene이 작동되면 계속적으로 IAA를 생산하므로 (Nakajima *et al.*, 1981) tobacco crown gall cell들이 hormone free 배지에서도 성장할 수 있다는 보고

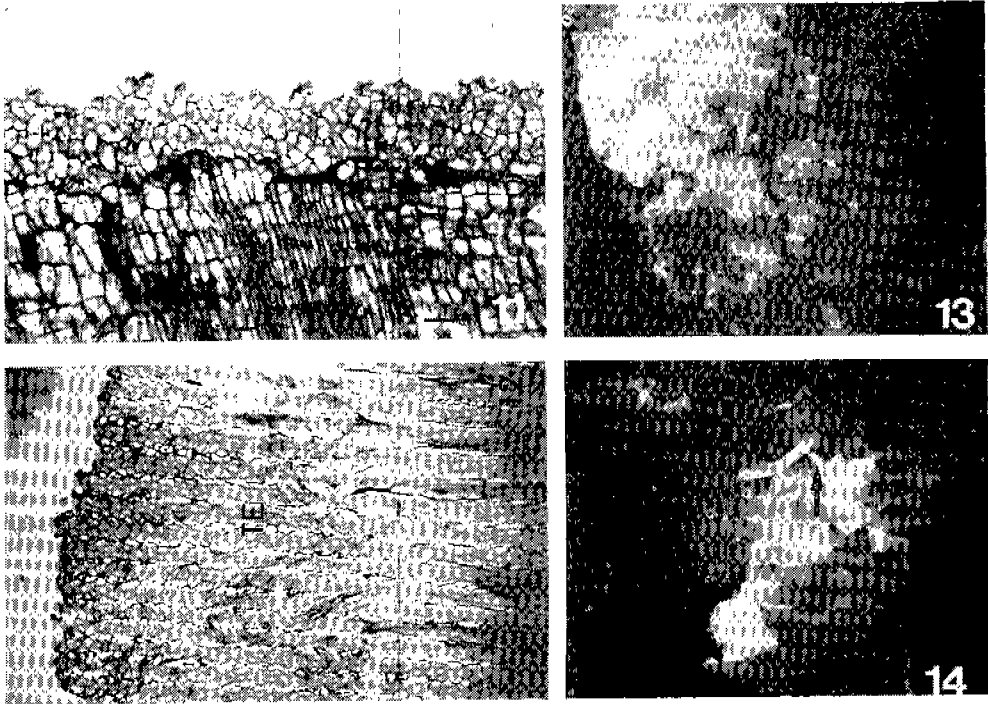


Fig. 11. Callus formed on explant after 9 days of culture on non treated with *Agrobacterium* (Scale: $50\mu\text{m}$). (C: cambium)

Fig. 12. Tangential section of wound callus formed on explant after 23 days of culture on non-treated with bacteria. No differentiation of meristemoid within tumor (Scale: $100\mu\text{m}$). (TE: tracheary element)

Fig. 13. Growth of tumor tissues induced by *Agrobacterium* on hormone free medium ($\times 6$).

Fig. 14. Continuous hairy root formation from tumor tissues on hormone free medium ($\times 6$).

(Matsumoto *et al.*, 1975)와 hairy root를 배양한 보고 (Spano *et al.*, 1981) 등과 동일한 결과를 보여주고 있다. 그러나 정상적인 당근 callus의 지속적인 성장에는 auxin 및 cytokinin 등의 hormone의 공급이 있어야 되므로 이와같은 tumor 조직등이 형질전환이 된 것을 확인할 수 있었다.

고 활

*A. rhizogenes*에 의하여 식물조직에서 tumor 및 hairy root가 유도 되는 것은 Ti plasmid의 T-DNA에서와 같이 이 균이 가진 Ri plasmid의 T-DNA에 의하여 transformed된 식물 세포에서 phytohormone 합성계가 영향을 받은 결과에 의한 것으로 생각되어져 본 실험을 행하였다.

*A. tumefaciens*에서는 wounded site에 있는 target cell에 작용하여 형질 전환을 일으켜 정상적인 세포가 Crown gall세포로 되는데 이때 Ti-plasmid의 T-DNA에는 비정상적으로 많은 양의 IAA를 생산하는 gene을 가지고 있어서 일단 이 유전인자가 작동되면 IAA를 계속

생산하는 positive feedback기구를 갖게 된다고 하였는데 (Meins, 1975), 본 실험에서도 transformed된 조직에서 많은 양의 IAA를 확인하여 *A. rhizogenes*에 의하여서도 이와 같은 기작으로 IAA가 생산되는 것으로 생각되어졌다. 그러나 이와 같은 IAA의 측정에는 당근 개체 및 형성층의 분포, 형태 등과 같은 요인이 고려되어야 되리라 생각되었다. 한편 tumor 조직에서의 내재 IAA양의 증감과 hairy root의 유도 및 성장, 통도 요소등의 분화와는 일치되는 결과를 보여줘 hairy root의 분화에 합성되는 IAA가 사용된다고 생각되어졌다. 또한 대조구에서도 wound healing의 결과로 IAA의 합성 및 wound callus가 형성되는 것을 확인할 수 있지만 균치리구에서와 같이 발달된 tumor, hairy root 및 통도 요소의 분화는 볼수 없었다. 한편 이와 같이 *A. rhizogenes*에 의하여 유도되는 transformed root는 *A. rhizogenes*의 phenotype (reduced apical dominance, plagiotropism)을 가지고 있고 Ti plasmid의 T-DNA와는 달리 Ri-plasmid의 T-DNA는 식물체에 적응하는 성질이 있어 감염된 식물에 secondary root system을 발달시켜 flooding에 의한 anoxia나 drought를 방지시켜 줄 수 있고 (Tefer, 1983), Moore등은(1979) *A. rhizogenes*를 감염시킨 나무가 감염되지 않은 나무보다 가뭄에 잘 견디는 것을 보고하여 이와같은 *A. rhizogenes*의 phenotype을 유용하게 이용할 가능성도 보여주고 있다.

적 요

*Agrobacterium rhizogenes*에 의하여 tumor 및 hairy root 형성에 대한 생리학적 연구의 첫단계로 이균에 의하여 감염된 당근조직에서의 IAA 함량과 형태적인 특징과의 관계에 대한 연구결과 다음과 같은 몇가지 결론을 얻었다. 균치리한 조직 및 tumor 조직에서는 대조구에서 보다 많은 IAA 함량을 측정하였고 이들 균치리한 조직에서 meristemoid의 형성 및 통도요소등의 분화를 확인하였다. 또한 이를 meristemoid로 부터 hairy root의 분화가 일어나며 이와같은 hairy root의 분화 및 통도요소등이 형성될 때 IAA 함량이 급격하게 감소하는 것도 확인할 수 있었다. 또한 대조구에서도 wound callus가 약간 형성되나 균치리구에서와 같이 조직내의 분화는 거의 일어나지 않았다. 한편 tumor 조직을 hormone free 배지에 배양하여 지속적인 성장 및 분화를 확인하였다.

참 고 문 헌

- Akiyoshi, D.E., R.O. Morris, R. Hinz, B.S. Mischke, T. Kosuge, D.J. Garfinkel, M.P. Gordon and E.W. Nester. 1983. Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 407-411.
- Amasino, R.M. and C.O. Miller. 1982. Hormonal control of tobacco crown gall tumor morphology. *Plant Physiol.* 69: 389-392.
- Atsumi, S. and T. Hayashi 1978. The relationship between auxin concentration, auxin protection and auxin destruction in crown gall cells cultured in vitro. *Plant Cell Physiol* 19: 1391-1397.
- Chilton, M.A., D.A. Tefer, A. Petit, C. David, F. Casse-Delbert and J. Tempe. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295: 432-434.
- Elliot, C. 1951. Manual of Bacterial Plant Pathogenes. 2nd rev., pp.3-5, Chronica, Botanica, Waltham Mass.
- Fosket, D.E. 1970. The time course of xylem differentiation and its relation to deoxyribonucleic acid

- synthesis in cultured *Coleus* stem segments. *Plant Physiol.* 46: 64-68.
- Inze, D., A. Follin, M. Van Lijsebettens, C. Simoens, C. Genetello, M. Van Montagu and J. Schell. 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3 acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 194: 265-274.
- Kado, C.I. 1984. Phytohormone mediated tumorigenesis by plant pathogenic bacteria in "Genes involved in Microbe-Plant Interactions" ed. Verma, DP. S. and T.H. Hohn (ed.). Springer-Verlag. pp.311-336.
- Kahl, G. 1982. Molecular Biology of Wound Healing: The conditioning phenomenon in "Molecular Biology of Plant Tumors." Kahl, G., and J.S. Schell (ed.). Academic Press pp.211-267.
- Kemper E., S. Waffenschmidt, E.W. Weiler, T. Raush and J. Schroder 1985. T-DNA encoded auxin formation in crown gall cells. *Planta* 163: 257-262.
- Matsumoto, T., K. Okunishi, K. Nishida, N. Noguchi 1975. Growth profiles of crown gall cells of tobacco in suspension culture. *Agr. Biol. Chem.* 39: 485-490.
- Meins, F. Jr. 1975. Temperature-sensitive expression of auxin-autotrophy by crown gall teratoma cells of tobacco. *Planta* 122: 1-9.
- Moore, L., G. Warren and G. Strobel 1979. Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *A. rhizogenes*. *Plasmid* 2: 617-626.
- Nakajima, H., T. Yokoda, N. Takhashi, T. Matsumoto and M. Noguchi 1981. Changes in endogenous Ribosyl-trans-zeatin and IAA levels in relation to the proliferation of tobacco crown gall cells. *Plant Cell Physiol.* 22(8): 1405-1410.
- Nakano, M., E. Yuda and S. Nakagawa 1980. Studies on rooting of the Hardwood cuttings of Grapevine, cv. Delaware. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 48(4): 385-394.
- Odom, R.E. and W.J. Carpenter 1965. The relationship between endogenous indole auxins and the rooting of herbaceous cuttings. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 87: 494-501.
- Pengelly, W.L., F. Meins 1982. The relationship of IAA content and growth of crown gall tumor tissues of tobacco *Nicotiana tabacum* cultivar Turkish in culture. *Differentiation* 21: 27-31.
- Petit, A., C. David, G.A. Dahl, J.G. Ellis, P. Guyon, F. Casse-Delbart and J. Tempe 1983. Further extension of the opine concept; plasmids in *A. rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* 190: 204-214.
- Roberts, L.W. and S. Baba 1970. Auxin and kinetin interaction during xylem differentiation. *Mem. Fac. Sci. Kyoto Univ., Ser. Biol.* 3: 1-12.
- Sachs, T. 1973. The induction of vessel differentiation by auxin in "Plant growth substances" Proceedings of the 8th international conference on plant growth substances, Tokyo, Japan. pp.900-906.
- Spano, L., G.J. Wullems, R.A. Schilperoort and P. Costantino 1981. Hairy root; In Vitro growth properties of tissues induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tobacco. *Plant Sci. Letters* 23: 299-305.
- Tefer, D. 1983. The biology of genetic transformation of higher plants by *A. rhizogenes*. In "Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction." A. Puhler (ed.). Springer-Verlag.
- Thomashow, M.F., S. Hugly, W.G. Buchholz and L.S. Thomashow 1986. Molecular basis for the auxin-independent phenotype of crown gall tumor tissues. *Science* 231: 616-618.

- Weigel, U., W. Horn and B. Hock 1984. Endogenous auxin levels in terminal stem cuttings of *Chrysanthemum morifolium* during adventitious rooting. *Physiol. Plant.* 61: 422-428.
- Weiler, E.W. and K. Spanier 1981. Phytohormones in the formation of crown gall tumors. *Planta* 153: 326-337.
- Wheller, A.W. 1971. Auxins and cytokinins exuded during formation of roots by detached leaves and stems of dwarf French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 98: 128-135.
- White, F.F., and E.W. Nester 1980. Hairy root; plasmid encodes virulence traits in *A. rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 141: 1134-1141.
- White, F., F.G. Ghidossi, M.P. Gordon and E.W. Nester 1982. Tumor induction by *A. rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 3193-3197.

(1986. 10. 30 접수)