

Agrobacterium rhizogenes에 의한 Hairy Root 형성에 대한 생리학적 연구. III. 당근 세포에의 A. rhizogenes의 부착

황 백, 황 성 진, 안 준 철, 조 혜 선
전남대학교 자연과학대학 생물학과

Physiological Studies on the Formation of Hairy Root by the A. rhizogenes. III. Attachment of A. rhizogenes strain A4 to Carrot(Daucus carota L.) Cells

B. Hwang, S. J. Hwang, J.C. Ann and H. S. Jo
Department of Biology, Chonnam National University

ABSTRACT

In vitro attachment experiments of bacteria to surface of host plant cell were carried out using C¹⁴ labeled cells of A. rhizogenes strain A4 and carrot protoplasts isolated from suspension culture of cells. Protoplasts were cocultivated with A. rhizogenes at various times after their isolation.

Attachment kinetics showed that adherence of bacteria to protoplasts attained a maximum level within 120mins of co-cultivation. Maximum attachment occurred at pH 6.0 and 24-35°C.

Bacterial attachment was observed at both carrot cells with and without primary cell wall.

The inhibition of transformation on the carrot root discs by A. rhizogenes was observed when non-related strain and heat inactivated bacterial strain cells were pre-treated.

서 론

Agrobacteria에 의한 식물에서의 tumor 및 hairy root의 유도는 먼저 이들 bacteria가 갖는 tumor inducing(Ti) 및 root inducing(Ri) Plasmids가 숙주세포의 DNA내로 삽입되어 일어난다(1,5,11,19,23).

식물체에서 tumor 및 hairy root의 형성은 bacterial DNA(T-DNA)에 의해 식물세포에서 auxin, cytokinin과 같은 식물호르몬 및 opines과 같은 화합물을 합성토록 하는 유전자를 전환, 발현시키는 것으로 알려지고 있다(8,7,19). 그러므로 일단 형질전환된 식물체의 조직은 외부에서 호르몬의 공급 없이도 성장이 가능하다.

Agrobacteria에 의한 식물체에서의 형질전환 기작을 이해하는데 있어서 일차적으로 숙주식물세포에 bacteria의 부착과정이 연구되어야 하는데 부착과정은 숙주식물세포 표면과 bacteria의 세포벽에 존재하는 특별한 화합물의 상호작용 및 물리적인 영향에 의한 것으로 보여진다(14,

15,16,18,24).

본 연구에서는 이와같은 식물세포의 bacteria 부착과정을 알아보기 위해 동위원소로 표시된 A. rhizogenes strain A4를 사용, 당근 원형질체에 이 bacteria를 처리하여 세포벽의 성숙에 따르는 부착과정 및 그에 영향을 주는 여러 요인들을 조사하였으며 당근 뿌리 절편을 이용하여 숙주식물세포에 있어서 bacteria가 부착하는 특별한 감응 부위(specific receptor sites)의 존재를 살펴보았다.

방법 및 재료

Bacteria 배양

Agrobacterium rhizogenes strain A4를 potato extract medium(2% sucrose)에 사면배양한 후 액체배지에서 48 시간 진탕배양하여 사용하였다.

당근배양세포로부터 원형질체의 분리

당근 뿌리로부터 유도시킨 캘러스를 MS 기본배지

(2mg / l 2,4-D, 1mg / l kinetin, 3% sucrose, pH 5.8)에서 20일 간격으로 계대배양하여 이로부터 동일조성의 액체 배지로 옮겨 7일 간격으로 4주 이상 진탕배양(120rpm, 26 ± 1°C)한 것을 원형질체 분리재료로 사용하였다.

원형질체 분리는 새로운 배지로 옮겨 5일간 배양한 현탁 배양세포에 효소용액(2% cellulase O-R-10, 1% macerozyme O-R-10, pH 5.8)을 처리, 30°C 수조에서 5시간 진탕한 후 50, 100 μm stainless mesh로 여과하여 0.6M CPW solution으로 2회 세척한 다음 이를 다시 21% sucrose solution에서 정제한 것을 시료로 사용하였다(5, 22).

A. rhizogenes에 동위원소표지

A. rhizogenes를 C¹⁴-leucine(0.2 μci / ml)이 포함된 potato extract medium에 14시간 배양(27°C)한 후 이를 phosphate buffer saline(PBS; 0.43% KH₂ PO₄, 1.48% NaH₂ PO₄, 7.2g NaCl / l)으로 3회 세척하여 사용하였으며, bacteria수는 hemocytometer로 측정하였다.

원형질체에의 bacteria부착

당근 진탕배양세포로부터 분리한 원형질체 1ml(2×10⁴ protoplasts / ml)에 0.1ml C¹⁴-labeled A. rhizogenes(6×10⁹ cells / ml) 와 0.5ml PBS buffer, 0.25ml distilled H₂O를 혼합하였으며, 배지 및 buffer의 pH는 각각 1 / 10N NaOH를 사용 자기 4, 5, 6, 7로 조정하였다.

혼합된 용액을 4, 24, 35, 45°C에서 2시간 동안 각각 진탕배양한후 이를 원형질체막에 부착되지 않은 bacteria만을 제거하기 위해 8 μm membrane filter로 여과한 후 이 filler를 10ml MS 기본배지로 3회 세척하고 건조시켜 scintillation counting vial에 넣고 여기에 10ml cocktail fluid(INST-GEL, PADRO INST Co.)를 첨가하여 Tris Carb C-S analyzer(PARKARD INST Co. Model 1500)로 radioactivity를 측정하여 bacteria의 부착율을 보았다.

식물세포벽 재생에 따른 bacteria 부착의 영향

당근 진탕배양 세포로부터 분리한 원형질체를 MS기본 배지(2mg / l, 2,4-D, 1mg / l Kinetin 0.5M manitd, pH 5.8)에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 0.01% FDA(fluorescein diacetate)와 0.1% Calcofluor White를 처리하여 형광현미경하에서 원형질체의 viability 및 세포벽재생에 따르는 bacteria 부착의 영향을 보았다(3, 4).

식물세포 표면에 있어서 bacterial specific receptor sites 조사

당근뿌리 절편에 strain이 다른 bacteria 및 heat-

inactivated bacteria를 처리한 후 30분이 지난다음 동일개 체수의 A. rhizogenes strain A4를 접종하여 이를 3주간 27°C에서 배양, 당근 뿌리 절편으로부터 hairy root 유도를 조사하여, 전처리한 bacteria에 의해 포화되리라 생각 되는 식물세포 표면에 특별한 bacteria 감응부위(receptor site)의 유무를 조사하였다.

결과 및 고찰

Bacteria의 부착율 조사

Fig. 1 은 당근배양세포로부터 분리한 원형질체에 C¹⁴-leucine으로 표지된 A. rhizogenes를 처리한 후 120분 동안 원형질체막에 균의 부착율을 본것으로 배양 120분 까지 유의적인 부착율의 증가를 나타내었다.

이는 Ohyama등(20)이 당근배양세포에 ³²P가 표지된 A. tumefaciens를 혼합배양시 배양 60분부터 부착율이 증가하여 120분 후에 최고치를 나타내었다는 결과와 Mathysse등(17)이 당근원형질체와 A. tumefaciens A6를 혼합배양시 이와동일한 결과를 얻은것과 비교할 때 본 실험결과에서 나타난 A. rhizogenes에 있어서 식물세포 표면에서의 부착과정은 A. tumefaciens와 유사한 것으로 보여졌다.

그러나, bacterial strain 및 숙주식물체의 종에따라 부착율이 약간의 차이를 나타내는 것으로 알려지고 있다.

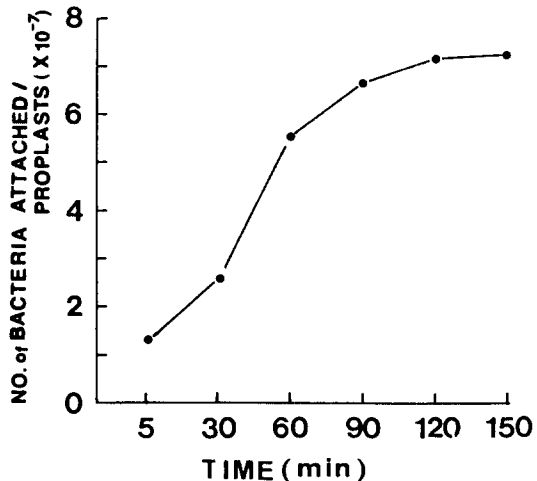


Fig. 1. Time course of attachment of A. rhizogenes to carrot protoplasts. Experiments were carried out at pH 6.0, 24°C. Data are expressed as number of bacteria attached per 2X10⁴ protoplasts.

Bacteria부착에 미치는 pH 및 온도의 영향

Fig. 2, 3 은 당근원형질체막에 bacteria의 부착에 있어서 pH 및 온도의 영향을 본 것으로 최적 pH는 6.0이었는데 이와같은 결과는 당근 진탕배양세포의 *A. tumefaciens* 부착이 pH6.0에서 최대를 이루었다는 보고등(21)

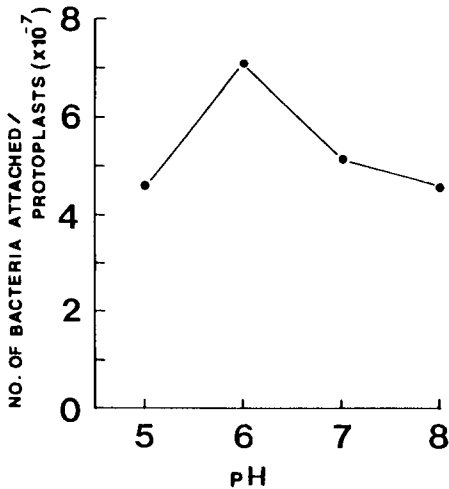


Fig. 2. Effect of pH on attachment of *A. rhizogenes* to carrot protoplast. Experiments were carried out at 24°C for 120 min. Data are expressed as number of bacteria attached per 2×10^4 protoplasts.

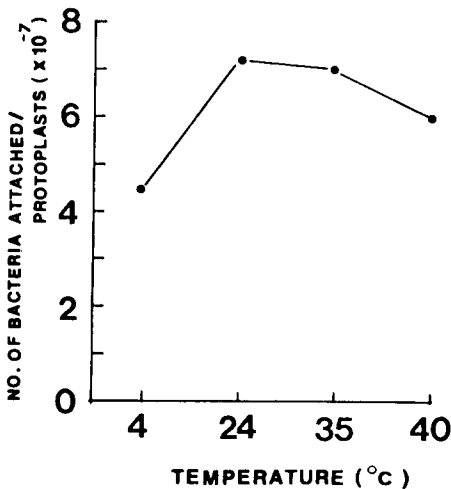


Fig. 3. Effect of temperature on attachment of *A. rhizogenes* to carrot protoplasts. Experiments were carried out at pH 6.0 for 120 min. Data are expressed as number of bacteria attached per 2×10^4 protoplasts.

과, 감자 괴경에의 bacteria 부착이 pH 7.2에서 최적이었다는 실험결과(20)와 일치되는 것이며, 최적온도는 24-35°C에서 이루어졌는데, Lippincott 등(12)은 0°C이하와 47°C 이상에서는 부착율이 각각 50%와 10% 이하로 떨어지며, Kluepfel & Pueppke등(8)은 6°C-32°C 사이에서 별차이 없이 높은 부착율을 나타낸다는 보고등과 비교할 때 식물세포에의 bacteria의 부착에 있어서 온도의 범위는 상당히 넓은 폭을 이루는 것으로 사료되었다.

식물세포벽 재생에 따른 bacteria의 부착율 조사

Fig. 4, 5 는 진탕배양 세포로부터 분리된 원형질체에 FDA를 처리하여 형광현미경하에서 원형질체의 viability를 조사한 것이며, 48시간 배양한후 Calcofluor White를 처리하여 형광현미경하에서 세포벽 재합성을 살펴본 것이다.

Table 1은 분리된 원형질체를 72시간 배양하면서 24시간 간격으로 bacteria를 혼합배양하였을 때 당근원형질체의 세포벽재생에 따른 bacteria부착율로서 유의적인 차이는 볼 수 없었다.

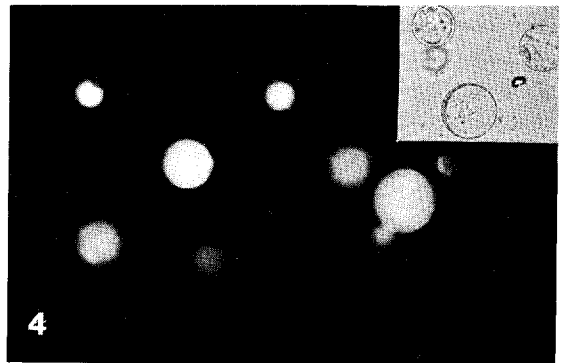


Fig. 4. Protoplasts of cultured carrot cell in the presence of FDA illuminated with UV light. Viable protoplasts are fluoresce.

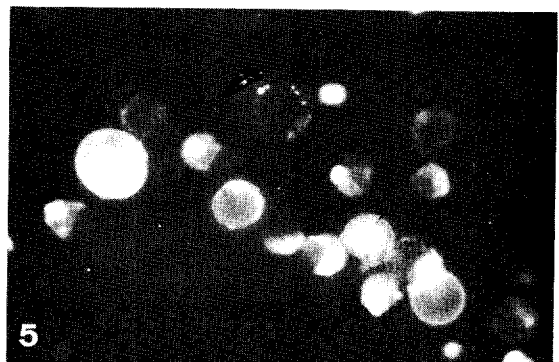


Fig. 5. Protoplasts showing cell wall regeneration. Calcofluor staining with UV light.

Lippincott등(12, 13)은 식물세포벽에 bacteria가 부착할 수 있는 부위가 존재하기 때문에 세포벽합성이 선행되어야한다고 보았으나, Firoozabady, E & D. W. Galbath (2)는 *A. tumefaciens*와 *N. tabaccum*의 혼합배양시 bacteria 부착에 있어서 세포벽에 의해 영향을 받지 않는다고 하였다.

본 실험결과 원형질체와 세포벽이 합성된 세포에서 bacteria의 부착이 별차이없이 나타났는데, 이는 Matthysse등(17)의 carrot에의 *A. tumefaciens*의 부착실험, 그리고 Krens등(9)의 tobacco에의 *A. tumefaciens*부착 연구에서 세포벽과 원형질막 모두에 bacteria가 부착할 수 있다는 보고등과 일치한다.

Table 1. Effect of protoplasts age attachment of *A. rhizogenes*.

Protoplasts age(hr)	No. of bacteria attached /protoplasts($\times 10^6$) ¹
2	7.1 \pm 0.20
24	7.4 \pm 0.15
48	7.3 \pm 0.13
72	7.3 \pm 0.07

1; Data are expressed as number of bacteria attached per 2×10^4 protoplasts.

식물세포 표면에 있어서 bacterial specific receptor sites조사

Table 2와 Fig. 6, 7은 당근뿌리 절편에 *A. tumefaciens*와 heat-inactivated bacteria를 전처리하였을때 *A. rhizogenes*에 의한 당근조직에서의 hairy root형성이 다소 억제되는 현상을 보여주는 것으로, Lippincott B.B. & J.A.

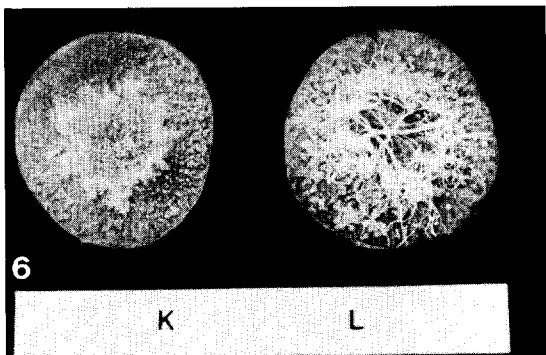


Fig. 6. Morphological changes on surface of carrot root discs infected with heat-inactivated (K) and viable (L) bacteria.

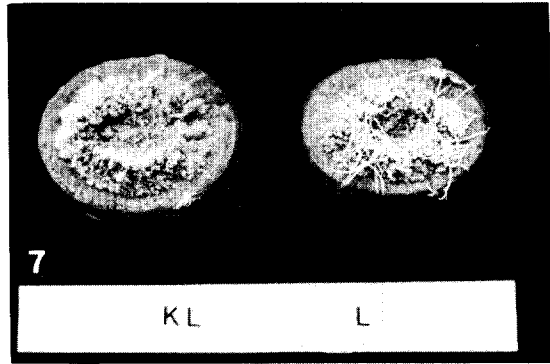


Fig. 7. Morphological changes on surface of carrot root discs infected with *A. rhizogenes* strain A4.(L) Note the inhibition of hairy root formation when non-related or heat-inactivated bacteria were pre-treated. (KL)

Lippincott(11)는 식물세포벽에 bacteria가 부착할 수 있는 specific receptor sites가 존재한다고 보았으나, 본 실험결과 식물세포 표면에 specific receptor sites가 존재한다기 보다는 일련의 물리 화학적작용에 의해 bacteria가 식물세포 표면에 일단 부착을 하는데 있어서 전처리한 bacteria에 의해 경쟁적 저해를 받음으로서 형질전환이 다소 억제되는 것으로 사료되어졌다.

Table 2. Ability of non-related viable and heat-inactivated strains to inhibit transformation of *A. rhizogenes* strain A4.

Inoculum ¹	Hairy root formation
<i>A. rhizogenes</i> ²	+
<i>A. tumefaciens</i> ³	-
Heated <i>A. rhizogenes</i>	-
- viable <i>A. rhizogenes</i>	-
Heated <i>A. tumefaciens</i>	-
- viable <i>A. rhizogenes</i>	-
Viable <i>A. tumefaciens</i>	-
- viable <i>A. rhizogenes</i>	-

1; A dash is used to indicated on elapsed time ca.30 min between the addition of the first and second bacterial strains.

2; *Agrobacterium rhizogenes* strain A4.

3; *Agrobacterium tumefaciens* strain ATCC: 15955, KFCC: 11388

요 약

당근 진탕배양세포로부터 분리한 원형질체에 *A. rhizogenes*를 처리하여 bacteria의 부착과 부착과정에 영향을 주는 여러 요인들을 조사하였다. 또한 당근뿌리 절편에 strain이 다른 bacteria와 heat-inactivated bacteria를 전처리한 후 *A. rhizogenes* strain A4를 접종하여 식물세포 표면에 있어서 bacterial specific receptor sites 존재 유무를 살펴보았다.

Bacteria의 부착은 pH 6.0, 24-35°C 조건하에서 120분 동안 원형질체막에 유의적인 증가를 나타내었으며, 또한 세포벽합성에 따르는 bacteria부착의 영향은 볼 수 없었다.

Strain이 다른 bacteria나 heat-inactivated bacteria의 전처리에 의한 *A. rhizogenes*의 당근조직에서 hairy root 형성 억제 현상은 식물세포 표면에 specific receptor sites가 존재 한다기보다는 부착에 있어서 전처리한 bacteria의 경쟁적 저해작용으로 형질전환이 다소 억제되는 것으로 사료되어졌다.

감 사

본 연구는 1987년도 문교부 기초과학 연구조성비 일부의 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

- M.D. Chilton M.M. Drummond, D.J. Merlo, D. Sciaky, A.L. Montoya, M.P. Gordon & E.W. Nester(1977) *Cell*, **11**; 263
- E. Firoozabady & D. Galbraith(1984) *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **3**; 175
- J.P., Freeman J. Draper, M.R. Davey, E.C. Cocking, K.M.A. Gartland, K. Harding & D. Pental(1984) *Plant & Cell Physiol.*, **25**(8); 1353
- O.L. Gamborg & Wetter L.R.(1975) *Plant Tissue Culture Method* ed. Nat. Res. Council, Canada, Saskatoon.
- W. Glogowski & A.G. Galsky(1978) *Plant Physiol.*, **61**; 1031
- P.J.J. Hooykass, P.M. Klapwijk, M.P. Nuti, R.A. Schipleroort, & A. Rorsch(1977) *J Gen. Microbiol.*, **98**; 477
- D. Inze, A. Follin, M.V. Lijsebettens, C. Simoens, C. Genetello, M.V. Montagu, & J. Schell(1984) *Mol. Gen. Genet.*, **194**; 265
- A.D. Klupfel & S.G. Pueppke(1986) *App. & Env. Microbiol.*, **51**(5); 1130
- F.A. Krens, L. Molendijk, G.J. Wullem, & R.A. Schipleroort (1985) *Planta*, **166**; 300
- P.J. Larkin(1976) *Planta*, **126**; 213
- J.A Lippincott & B.B. Lippincott(1969) *J. of Bac.*, **97**(4); 620
- J.A. Lippincott & B.B. Lippincott(1977) In "Cell wall biochemistry related to specificity in host-plant pathogen interactions". pp.439 ed. Solheim B. & J. Raa, Tromso, Norway; Universitets-Forlaget
- J.A. Lippincott, B.B. Lippincott, & M.H. Whatley (1978) *Plant Phy.*, **59**; 388
- Lippincott J.A. & B.B Lippincott(1980) In "Bacterial adherence in receptors & recognition" Vol.6, pp.377 ed. Beachey E.H., London: Chapman & Hall.
- A.G. Matthyse, P.M. Wyman, & K.V. Holmes(1978) *Infect. & Immun.*, **22**(2); 516
- A.G. Matthyse, K.V. Holmes, & R.H.G. Gurlitz(1981) *J. of Bac.* **145**(1); 583
- A.G. Matthyse, K.V. Holmes, & R.H.G. Gurlitz(1982) *Phy. Plant Pathol.*, **20**; 27
- A.G. Matthyse(1983) *J. of Bac.*, **154**(2); 906
- E.W. Nester, Milton P.G., R.M. Amasino, & M.F. Yanofsky(1984) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**; 387.
- K. Ohyama, L.E. Pelchere, & A. Schaefer(1979) *Plant Phy.*, **63**; 382.
- S.G. Pueppke & U.K. Benny(1984) *Can.J. Microbiol.*, **30**; 1030
- N.S. Shekhawat, & A.W. Galston(1983) *Plant Cell Rep.*, **2**; 1191
- M.F. Thomashow, J.E. Karlinsey, J.R. Marks, & R.E. Hurlbert(1987) *J. of Bac.*, **169**(7); 3209
- M.H. Whatly, J.S. Bodwin, B.B. Lippincott, & J.A. Lippincott.(1976) *Infect. & Immun.*

(Recieved June 2, 1989)