

## 연초 Crown Gall Callus 유래 Teratoma Shoot의 생장특성

양덕춘 · 최광태

한국인삼연초연구소

### Growth Characteristics of Teratoma Shoot derived from Crown Gall Callus of *Nicotiana tabacum* cv. NC2326

D. C. Yang and K. T. Choi

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345

#### ABSTRACT

The present study was conducted to obtain some basic information on the shoot formation from crown gall callus and the characteristics of teratoma shoot derived from crown gall induced by inoculation of *Agrobacterium tumefaciens* C58. Crown gall callus could be continuously cultured on the phytohormone free basic medium. The growth of crown gall callus was inhibited when BA were added to the cultural media. Shoot formation from crown gall callus fail to be initiated except teratoma shoot which induced on the phytohormone free medium after several subculture on rare occasions. Teratoma shoot could not form root and grow as normal shoot. Addition of BA to cultural media was not effective for shoot elongation, reduction in multiple shoot formation, but IBA was somewhat effective for shoot elongation of teratoma shoot, never for root formation.

#### 서 론

외부유전자를 식물세포내로 도입하기 위한 식물형질전환용 운반체로서 자연상태에서 crown gall을 형성하는 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti-plasmid가 가장 많이 이용되고 있다<sup>5,6,7</sup>. Crown gall은 주로 쌍자엽식물에서 많이 형성되는데<sup>8</sup> Ti-plasmid의 일부인 T-DNA가 식물세포이 염색체 DNA에 삽입되어 형질전환이 일어남으로써 형성되며 형성된 gall은 T-DNA내의 식물호르몬 자가합성유전자가 내재되게 되어 조직배양시 식물호르몬 무첨가배지에서도 왕성하게 성장하게 된다<sup>7,10,12</sup>. Crown gall로부터 유기된

callus는 자체조직내에서 식물호르몬을 과잉생산함으로써 주로 종양덩어리상태로 분화되기 때문에 형질전환에 사용된 식물체와 박테리아의 종에 따라서 다소 차이가 있지만, 외부에서 식물호르몬의 처리에 의한 재분화는 어려운것으로 보고 되어 있다<sup>4,13,14,17</sup>.

본연구는 연초조직에 인위적인 상처를 주고 *A. tumefaciens* C58을 감염시켜 crown gall callus를 유기한후 재분화 가능성을 조사하였으며, 자발적으로 유기된 teratoma shoot의 생장에 미치는 BA와 IBA의 효과를 구명하였던 바, 그결과를 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. Crown gall 및 gall callus 유기

본실험에 사용한 연초는 *Nicotiana tabacum* cv. NC 2326이며, crown gall은 nopaline type인 *Agrobacterium tumefaciens* C58균주를 연초의 줄기에 상처를 주고 접종하여 유기된 조직을 사용하였다<sup>9)</sup>. Gall callus의 유기는 연초의 줄기에 형성된 crown gall 조직을 채취하여 멸균한후 carbenicillin이 250 $\mu$ g/ml 첨가되고, 식물호르몬은 전혀 첨가되지않은 Murashige and Skoog(MS) 개량배지에 치상하여 25 $^{\circ}$ C 배양실에서 배양하면서 callus의 유기를 관찰하였다. 형성된 gall callus는 계속 carbenicillin이 첨가된 배지에서 3회 더 계대배양하여 *A. tumefaciens*를 완전히 제거한후에 carbenicillin이 첨가되지않은 MS배지에서 배양한후 다음 실험에 사용하였다.

### 2. Gall callus의 재분화 및 teratoma shoot의 유기

형성된 Gall callus로부터 식물체를 유기하기 위하여 N<sup>6</sup>-benzylaminopurine(BA)의 농도를 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0mg/l 각각 첨가하여 광이 조사된 25 $^{\circ}$ C의 배양실에서 배양하여 2개월후에 shoot의 형성율을 조사하였다. 또한 식물호르몬 무첨가배지에서 계속적인 계대배양동안 자발적으로 형성된 기형의 shoot군을 계속 동일배지에 계대하여 teratoma

shoot의 형성율을 조사하였으며 기형의 shoot군에서 단일 shoot를 획득하였다.

### 3. Teratoma shoot의 성장특성

형성된 단일 teratoma shoot의 생육과 발근여부를 조사하기위해서 100mg/l inositol과 30g/l의 sucrose를 1/2 MS 배지에 첨가하여 멸균한 후 teratoma shoot와 정상 shoot를 접종하여 생육상을 상호 비교 관찰하였다. 또한 teratoma shoot의 생육에 미치는 BA의 효과를 조사하기 위해서 BA농도를 0, 0.5, 1.0, 1.5mg/l로 처리하여 20일간 25 $^{\circ}$ C에서 광상태로 배양한후 shoot의 길이와 shoot의 수를 조사하였으며, 뿌리의 발근을 유도하기위해서 indole-3-butyric acid(IBA)의 농도를 0, 1, 3, 5, 10mg/l 처리하여 발근율을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Gall callus의 재분화 및 teratoma shoot의 유기

*Nicotiana tabacum* cv. NC2326줄기에 인위적인 상처를 주고 nopaline type인 gall조직을 채취하여 멸균한 후 carbenicillin이 250 $\mu$ g/ml 첨가되고, 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 Murashige and Skoog (MS)배지에 치상하면 배양 10일후부터 미색을 띠

Table 1. The effect BA on the shoot formation of normal and gall calli derived from *N. tabacum* cv. NC2326 for 2 months

Concentration (mg/l)	Shoot formation(%) of		Fresh weight(g/flask) of gall callus
	Normal callus	Gall callus	
0.00	0	0	9.22 $\pm$ 0.47
0.05	15	0	8.45 $\pm$ 0.27
0.10	60	0	7.80 $\pm$ 0.28
0.50	95	0	7.31 $\pm$ 0.26
1.00	95	0	7.34 $\pm$ 0.34
3.00	95	0	6.17 $\pm$ 0.48

반구형의 단단한 gall callus가 형성된다<sup>9)</sup>.

형성된 연초 crown gall callus로 부터 shoot를 유기하기 위해서 BA의 농도를 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0mg/l를 첨가하여 정상 callus와 gall callus를 접종하여 배양한 결과, 정상 callus의 경우에는 BA 무첨가구를 제외하고는 모두 처음에 미색의 callus가 형성되다가 15일이 경과한 후 녹색의 callus로 변화하면서 30일 후에는 shoot가 형성되었고, 특히 BA 0.5mg/l이상의 농도에서는 95%의 shoot 형성을 나타내었다(Table 1). 그러나 gall callus의 경우에는 60일이 경과한 뒤에도 BA의 처리농도에 관계없이 전혀 shoot가 형성되지 않았으며 딱딱한 반구형의 callus만이 계속 형성되었다(Table 1). 또한 callus의 성장도 정상callus와 매우 다른 성장양상을 보였는데 정상 callus의 경우에는 BA의 무첨가배지에서 갈변화현상이 일어나 생장이 되지않았으나 gall callus의 경우에는 BA의 무첨가배지에서 오히려 생장이 가장 좋았으며 BA의 농도가 높을수록 callus의 생체중은 감소하는 경향을 보였다(Table 1).

그러나 식물호르몬 무첨가배지에서도 몇회의 계대 배양을 계속하면 빈도는 낮지만 단단한 반구형의 callus(Fig. 1-A)의 일부가 간혹 터져 friable한 상태의 callus가 되면서 그부위가 녹색으로 변하여 shoot가 형성되는 경우를 관찰할 수 있었다(Fig. 1-B).

Shoot가 형성된 callus를 다시 식물호르몬 무첨가배지에 계대배양하면 거의 80% 이상 shoot가 형성되었으며(Fig. 1-C), 다시 shoot가 형성된 callus를 동일 배지에 계대배양하면 100%가 shoot가 형성되었다(Fig. 1-4).

그러나 형성된 shoot를 절취하여 식물호르몬 무첨가배지에 치상하면 shoot가 정상적으로 생장을 하지 못하고 옆에서 새로운 기형의 shoot가 다량 형성되었다(Fig. 2). 또한 기형의 shoot의 잎을 절편으로 하여 다시 식물호르몬 무첨가배지에 접종하였던 바, 정상 식물체 절편에서는 전혀 shoot가 형성되지 않았지만(Table 1) 기형의 shoot 절편에서는 shoot가 형성되긴 하였으나 모두 teratoma shoot로 성장하였다(Fig. 3)

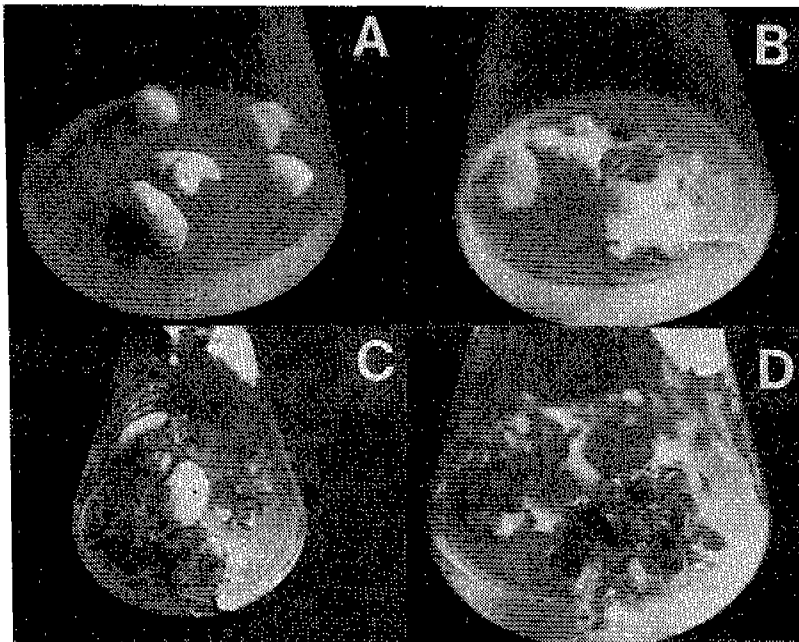


Fig. 1. Crown gall calli(A) and shoots(B, C and D) derived from the tobacco plant infected by *Agrobacterium tumefaciens* C58.

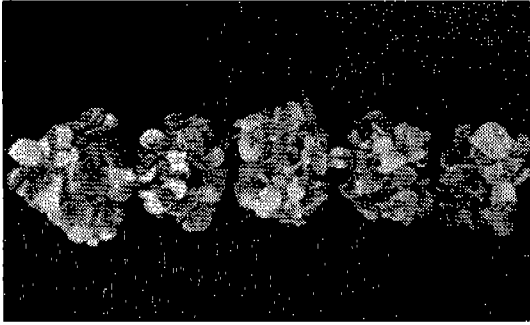


Fig. 2. Shoots derived from tobacco gall callus cultured on the phytohormone-free medium. These shoots did not grow as normal shoots.

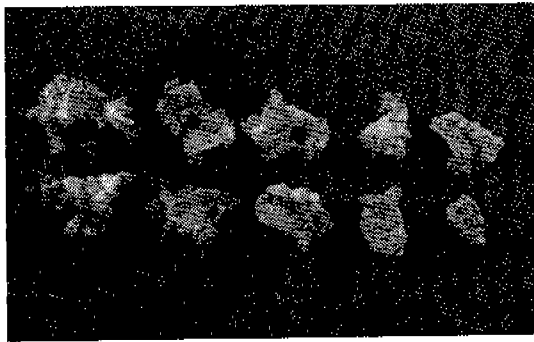


Fig. 3. Teratoma shoots initiated from shoot explants differentiated from crown gall callus.

일반적으로 crown gall callus는 식물호르몬이 과잉생산되기 때문에 재분화가 무척 어려운것으로 보고되고 있으며<sup>4, 13)</sup>, 간혹 식물체의 종류와 사용균주 및 접종부위에 따라 teratoma가 형성되는데 이는 사용한 균주의 Ti-plasmid에 내재되어있는 T-DNA의 발현에 의하여 생성된 cytokinin과 auxin량과의 비율에 의하여 형성된다고 알려져 있다<sup>1)</sup>. 본실험에서 나타난 바와 같이 BA첨가시 gall callus에서 전혀 shoot가 형성되지 않고 종양덩어리상태의 callus만이 형성되며 오히려 BA의 농도가 높을수록 callus의 생장이 감소된것은 pTiC58의 T-DNA가 연초의 핵 DNA에 삽입되어 발현됨으로써 식물호르몬 과잉으로 인해서 생장이 억제된것으로 판단된다. 또한 계속적인 계대배양후에는 자발적인 teratoma shoot가 형성된것은 T-DNA가 핵 DNA내에 삽입시 무작위로 integration됨으로써 형질전환이 일어나 변이체가 만들어지는 바<sup>2, 11, 16)</sup>, 처음에는 서로 다른 변이체 callus 군이 함께 혼재되어 있다가 계대배양기간이 경과할수록 각각의 다른 변이체 callus의 특성으로 나타냄으로써 teratoma shoot가 형성된것으로 사료된다.

## 2. Teratoma shoot의 성장 특성조사

형성된 teratoma shoot의 성장특성을 조사하기 위해서 우선 식물호르몬이 전혀 첨가되지않은 MS배지에 단일 teratoma shoot를 치상하여(Fig. 4-A) 20일간



Fig. 4. Multiple teratoma shoots(B) cultured from single shoot(A) for 20 days on the phytohormone free medium.

배양한후 성장양상을 조사한 결과 shoot가 계속적으로 신장되지 못하고 옆에서 다른 많은 shoot만이 형성되었다(Fig. 4-B). 또한 정상적인 shoot와 teratoma shoot를 발근배지에 치상하여(Fig. 5-A) 배양한 결과 정상 shoot에서는 20일이 경과하면 뿌리의 발육이 양호하였으며 40일이 경과한후에는 Fig. 5-B-N에서 보는바와 같이 shoot의 신장도 양호하며 뿌리의 발육도 좋았다. 반면에 teratoma shoot의 경우에는

shoot의 신장도 거의 되지않았으며 발근배지임에도 불구하고 뿌리의 형성도 전혀 되지않은 경향을 보였다(Fig. 5-B-T).

### 3. Teratoma shoot의 성장과 뿌리형성에 미치는 BA 및 IBA의 영향

정상조직의 경우에는 shoot의 성장도 양호하며 뿌리의 발육도 매우 양호한 발근 배지에서 teratoma shoot의 경우에는 전혀 shoot의 신장도 되지않고 발근도 되지않으며 기형의 multiple shoots만 계속 형성시키고 전혀 뿌리를 형성하지 못했기 때문에 외부에서 식물호르몬의 처리에 의하여 shoot의 성장을 촉진시키고 또한 뿌리를 유기하기 위해서 각각 BA와 IBA를 처리하였다. 우선 multiple shoots를 감소시키고 shoot의 길이를 신장시키기 위해서 BA가 첨가된 배지에 teratoma shoot를 치상하여 20일간 배양한 결과, shoot의 신장에는 전혀 영향을 미치지 못하였으나, BA가 1mg/l 이상부터는 농도가 증가할수록 multiple shoots의 발생은 다소 감소되는 경향을 보였다(Table 2). 그러나 BA 0.5mg/l에서는 오히려 shoot의 수가 증가되었으며 많은 양의 callus가 형성되었고 BA 1.0, 1.5mg/l에서도 다소 callus가 형성되는 경향을 보였다(Table 2).

IBA의 처리에 의하여 teratoma shoot로부터 뿌리를 유기하기 위해서 IBA의 농도를 0, 1, 3, 5, 10 mg/l까지 처리하여 배양한 후 발근율을 조사한 결과

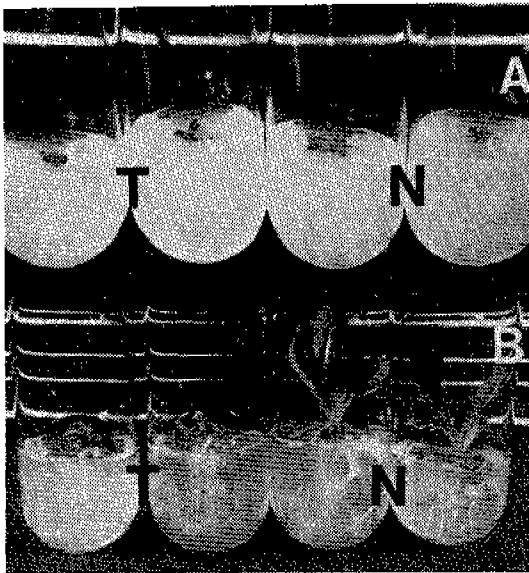


Fig. 5. Teratoma(T) and normal(N) shoots culcured on the rooting media. B was cultured for 40 days after inoculation of A.

Table 2. The effect of BA on the growth of teratoma shoot derived from crown gall callus in *N. tabacum* cv. NC2326

Con. of BA (mg/l)	No. of shoots per explant	Length of shoot(cm)	Fresh weght of regenerants(g/flask)
0.0	4.5	0.87	2.658
0.5	5.0	0.87	4.657
1.0	3.8	0.84	3.914
1.5	4.3	0.86	4.044
2.0	2.9	0.82	2.444

Table 3. The effect of IBA on the root formation and growth of teratoma shoot derived from crown gall callus in *N. tabacum* cv. NC2326

Conc. of IBA (mg/l)	Rooting ratio(%)	No of shoot per explant	Length of shoot(cm)	fresh weight of Regenerants(g/flask)
0	0	4.29	0.879	1.73±0.26
1	0	3.47	1.854	3.02±0.56
3	0	2.68	1.731	2.18±0.44
5	0	2.29	1.818	1.96±0.31
10	0	2.15	1.861	1.88±0.39

IBA의 처리에 의해서는 전혀 발근을 시킬수가 없었다 (Table 3). 그러나 오히려 shoot의 신장율은 IBA처리구가 IBA무처리구에 비해서 공히 2배 이상의 신장율을 보였으며 multiple shoots의 감소도 IBA의 농도가 증가할수록 감소되는 경향을 보였다(Table 3). 특히 IBA 1mg/l의 농도에서는 타처리구에 비해서 1.5배 가량의 callus의 증식효과를 나타내었다(Table 3).

Teratoma shoot에서 발근이 어렵다는 보고는 많이 되어 있으며<sup>11,12)</sup> 이는 *Agrobacterium tumefaciens*의 strain과 사용한 식물체의 종류에 따라 차이가 있으며 T-DNA의 발현에 의해서 생성되는 cytokinin의 과잉으로 인한 호르몬의 불균형에 의한 것으로 보고된 바 있다<sup>1)</sup>. 그러나 본실험에서 보는 바와 같이 shoot의 성장과 뿌리의 형성에 기본적으로 사용되는 BA와 IBA의 처리에도 불구하고 teratoma shoot는 전혀 반응을 나타내지 못했던 바, 이는 teratoma shoot에서 생성된 식물호르몬의 함량이 너무 높아 외부에서 추가로 첨가된 식물호르몬에 대해 전혀 반응을 나타내지 못한 것으로 생각되며 추후 식물호르몬의 정량 및 anti-hormone에 의한 teratoma shoot의 호르몬생성억제 등에 대한 광범위한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

식물세포의 유전자운반체로 사용되는 Ti-plasmid

의 일부인 T-DNA의 삽입에 의하여 형질전환된 연초조직으로부터 재분화체를 얻기 위한 연구의 일환으로, *N. tabacum* cv. NC2326의 줄기에 *A. tumefaciens* C58균주를 접종하여 형성된 crown gall callus로부터 재분화를 유도하였다. 정상연초조직에서는 재분화율이 95%가 되는 BA 0.5mg/l의 농도에서도 gall callus는 전혀 shoot 형성하지 못했으며, 오히려 단단한 미색의 callus만 형성하였다. 또한 callus의 생체중도 정상조직에서는 생장이 매우 미약한 식물 호르몬 무첨가배지에서 가장 높았으며 BA의 농도가 증가할수록 생체중은 감소하는 경향을 보였다. 그러나 계속적으로 gall callus를 계대배양을 하면 자발적인 shoot가 형성되었는데, 모두 정상적인 생장을 하지 못하는 teratoma shoot로 발달하였다. Teratoma shoot는 정상식물체와 같이 계속적인 생육이 되지 않았으며 발근배지에서도 전혀 뿌리를 형성하지 못하였다. Teratoma shoot의 생육에 BA는 전혀 영향을 미치지 못하였고 뿌리의 형성에 미치는 IBA의 효과는 전혀 없었으며 오히려 shoot의 생장을 다소 증가시켰으나 지속적인 생장은 되지않았다.

## 참고문헌

1. Akiyoshi, D. E., R. O. Morris, R. Hinz, B. S. Mischke, T. Kosuge, D. J. Gafinkel, M. P. Gordon and E. W. Nester, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 407-411(1983).

2. Barton, K. A. and M. D. Chilton, *Methods in Enzymology* 101 : 527-539(1983).
3. Binns, A. N., H. N. Wood, and A. C. Braun, *Differentiation* 19 : 97-101(1981)
4. Braun, A. C. and H. N. Wood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 : 77-98(1973).
5. Caplan, A. B., M. V. Montagu and J. Schell, *J. Bacteriol.* 16 : 655-664(1985).
6. Chilton, M. D., M. H. Drummond, D. J. Merlo, D. Sciaky, A. L. Montoya, M. P. Gordon and E. W. Nester, *Cell* 11 : 263-271 (1977).
7. Chilton, M. D., M. H. Drummond, D. J. Merlo and E. W. Nest, *Nature* 275(14) : 147-149(1978).
8. Cleen, M. D. Ley, *The Botanical Review* 42 (4) : 389-466(1976).
9. Choi, K. T. and D. C. Yang, *Korean J. of Breeding* 18(2) : 140-145(1986).
10. Drummond, M. H., M. P. Gordon, E. W. Nester and M. D. Chilton, *Nature* 269 : 535-536(1977).
11. Gresshoff, R. M., M. L. Skotnicki and B. G. Rolfe, *J. Bacteriol* 137 : 1020-1021(1979).
12. Hernalsteens, J. P., *Nature* 287(16) : 654-656(1980).
13. Horsch, R. B., E. W. Nester and R. T. Fraley, *Proc. N. A. S.* 83 : 2571-2575(1986)
14. Ooms, G., J. J. Hooykaas, G. Moolenaar and R. A. Schilperoort, *Gene* 14 : 33-50(1981).
15. Owens, L. D., *Plant Physiol.* 69 : 37-49 (1982).
16. Sacristan, M. D. and G. Melchers, *Mol. Gen. Genet.* 152 : 111-117(1977)
17. Turgeon, R., *Planta* 153 : 42-48(1981)