

연초 Crown Gall Tumor 와 Genetic Tumor의 식물호르몬에 대한 분화반응

양덕춘* · 정재훈¹ · 민병훈² · 최광태 · 이정명³

한국인삼연구소 연구원 유전생리부, ¹공주대학교 원예학과, ²배재대학교 원예학과, ³경희대학교 원예학과

Differential Response to Growth Regulator of Tobacco Crown Gall Tumor and Genetic Tumor

YANG, Deok Chun* · JUNG, Jae Hoon¹ · MIN, Byung Hoon² · CHOI, Kwang Tae · LEE, Jung Myung³

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

¹Department of Biology, Kongju National University, Yesan, Chung-Nam, 340-800, Korea

²Department of Horticulture, Paichai University, Taejon, 302-735, Korea

³Department of Horticulture, Kyung Hee University, Yongin, Kyungi-do, 449-701, Korea

ABSTRACT Morphological characteristic during formation of tobacco crown gall tumor and genetic tumor, and their differential response to growth regulator were investigated in *in vitro* culture. Crown gall tumor was induced from tumor tissue transformed by infecting *Agrobacterium tumefaciens* C58. Genetic tumor was induced from tumor tissue which was induced spontaneously from reciprocal interspecific hybrids between *Nicotiana glauca* (2n=24) and *Nicotiana langsdorffii* (2n=18). Morphological characteristic of crown gall tumor, genetic tumor, and teratoma shoot was very similar, and they were actively proliferated on hormone-free medium. Typical tumor callus and teratoma shoot formed from crown gall tumor on the hormone-free medium. On the contrary, tumor callus derived from genetic tumor formed as a crown gall tumor callus on the medium supplemented with 0.5 mg/L of 2,4-D, and lots of teratoma shoots without any root formed on the hormone-free medium. Root development from the teratoma shoots was hardly obtained on the medium with IAA, GA and active carbon. However, teratoma shoots with roots, as normal shoots, were initiated occasionally on the hormone-free medium. These shoots also formed new genetic tumor on the stem, which leaves formed lots of teratoma shoot on the hormone-free medium in *in vitro* culture.

Key words: Interspecific hybrid, *N. glauca*, *N. langsdorffii*, teratoma

서 론

식물체에서 유도되는 돌기는 바이러스가 원인이 되어 일어나는 wound tumor (Black 1965), *Rhizobium* spp.에 의해 주

로 두과 작물에서 형성되는 root nodule (Lim and Burton 1982), 그리고 여러 종류의 곤충 등에 의하여 유도되는 insect gall (Meyer 1982) 등이 있으며, 또한 본 실험에서 비교하고자 하는 crown gall tumor 및 genetic tumor가 가장 많이 보고되어 있다. 이 중에서 crown gall tumor는 Braun (1953)에 의해서 tumor의 형성원리에 대해서 자세히 보고가 되었으며, genetic tumor는 이미 1800년대에 알려져 왔고, 1873년 *Brassicaceae*과에서 처음으로 tumor조직이 보고되었으며

*Corresponding author. Tel 042-866-5434
E-mail dcyang@gr.kgtri.re.kr

(Caspary 1873), 1930년 Kostoff에 의해서 연초의 종간 잡종에서 tumor 조직이 발견됨이 보고되었다 (Kostoff 1930). Tumor 조직은 기내배양시 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배지에서도 매우 왕성하게 성장하는데, 자발적으로 연초의 종간 잡종에 의해서 일어나는 genetic tumor와 토양 미생물인 *Agrobacterium* spp.에 의하여 유도된 crown gall tumor와의 관계에 대한 연구가 생리적인 측면에서 연구되었다 (Sharp and Gunckel 1969; Ichikawa and Syono 1988; Ichikawa and Syono 1991). 그러나 상호교잡에 의한 연초 종간 잡종식물체의 식물호르몬에 의한 분화특성을 crown gall tumor와 상호 비교한 연구는 되어 있지 않으며, 이런 조직들의 식물호르몬에 의한 재분화연구는 미비한 상태이다. 따라서 본 연구는 연초의 *Nicotiana glauca*와 *Nicotiana langsdorffii*의 상호 잡종체에서 유도되는 genetic tumor와 *Agrobacterium*에 의하여 유도된 crown gall tumor의 형성과정에 있어서의 형태적 특성을 비교하고, 또한 식물호르몬에 대한 분화반응과, 특히 tumor조직의 재분화에 미치는 각종 호르몬 및 active carbon의 영향을 조사하였던 바, 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

연초 crown gall tumor 및 genetic tumor의 유기 및 형태적 특성조사

연초 crown gall tumor는 *Nicotiana tabacum*의 줄기에 상처를 주고 LB (Bacto-tryptone 10 g/L, Bacto-yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L) 배지에서 1일간 배양한 *Agrobacterium tumefaciens* C58을 감염시켜 유기하였으며, genetic tumor는 *Nicotiana glauca* (2N=24)와 *Nicotiana langsdorffii* (2N=18)의 식물체를 상호 교잡하여 획득한 종간 잡종종자를 피종하여 재배하면서 자발적으로 유기된 tumor조직의 형태적 특성을 조사하였다.

연초 tumor 조직의 형태에 미치는 2,4-D의 영향

형성된 crown gall tumor와 genetic tumor 조직을 절취하여 먼저 70% EtOH에서 3분간 침지후 2%의 NaOCl에서 15분간 소독 후 멸균증류수로 3회 세척하여 식물호르몬 무첨가 MS 기본배지에서 callus 형성여부를 조사하였다. 또한 형성된 tumor 조직에 2,4-D 0.5 mg/L을 첨가 및 무첨가하여 callus의 형태적 특성을 상호 비교 조사하였으며, 간혹 정상적으로 유기된 재분화식물체를 계속적으로 선발하고 발근배지에 옮겨 정상식물체의 생산여부를 조사하였다.

연초 teratoma shoot의 생장에 미치는 IAA, GA 및 active carbon의 영향

연초 teratoma shoot (*Nicotiana glauca* × *Nicotiana langsdorffii*)의 생장에 미치는 식물호르몬 및 active carbon의 영향을 조사하기 위해서 IAA (0, 1, 3, 5, 7, 10 mg/L), GA (0, 10, 20, 30, 40 mg/L) 그리고 active carbon (0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5%)이 첨가된 MS 배지를 autoclave에서 15분간 멸균한 후 식물호르몬 무첨가배지에서 유도된 teratoma shoot를 접종하였다. 배양은 25°C 배양실에서 광도를 각각 광 (9 μmoles/m²/s), 약광 (3 μmoles/m²/s), 그리고 암상태로 하여 배양하였으며 30일간 배양 후 생체중을 조사하였다. 처리간 표준오차는 30개 flask에서 조사된 생체중으로 구하였다.

결과 및 고찰

연초 crown gall tumor와 genetic tumor의 유기 및 형태적 특성

연초 *Nicotiana tabacum*의 줄기에 상처를 주고 토양미생물인 *Agrobacterium tumefaciens* C58을 감염시켜 2개월간 배양하였던 바, 많은 crown gall tumor를 관찰할 수 있었으며, 대부분 상처부위 전면에 퍼져 있었으나 재료에 따라서는 figure 1A와 같이 매우 크며, 등그렇고 미색을 띤 crown gall tumor도 관찰할 수 있었다. 또한 약 3개월 후에는 figure 1B와 같이 tumor 조직이 갈변하면서 그 사이에서 녹색을 띤 teratoma가 형성되는 것도 관찰할 수 있었다. 한편 *N. glauca* × *N. langsdorffii* 종간 잡종체에서는 상처를 주지 않았음에도 잡종체의 줄기에서 crown gall tumor (Figure 1A)와 비슷한 형태의 genetic tumor가 형성되었으며 (Figure 1D), 또한 재료에 따라서는 줄기가 찢어지면서 그 사이에서 많은 teratoma가 유기되는 것을 관찰할 수 있었는데 (Figure 1E), 이는 *Agrobacterium tumefaciens* C58을 감염시켜 유도된 teratoma와 매우 유사한 형태를 나타내었다. 그러나 *N. langsdorffii* × *N. glauca* 종간 잡종체에서는 줄기의 윗 부분에서는 거의 genetic tumor가 형성되지 않고 토양부근의 줄기에서만 genetic tumor가 형성되었으며 (Figure 1G), 크기도 *N. glauca* × *N. langsdorffii* 종간 잡종체에서 형성된 tumor보다 훨씬 적었고 완전한 녹색을 가진 teratoma는 형성되지 않았다 (Figure 1H).

연초 tumor 조직의 형태에 미치는 2,4-D의 영향

형성된 tumor 조직을 식물호르몬 무첨가배지에서 기내배양할 경우 일반조직을 배양할 경우보다 오염율이 매우 높긴 하였으나 *Agrobacterium*에 의해 유도된 crown gall tumor 조직은 미색이며 단단하고 반구형의 전형적인 tumor callus가 바로 형성되었고 (Figure 1C), genetic tumor의 경우 최초에는 등근형태의 단단한 분화체가 형성되면서 그 주위에 많은

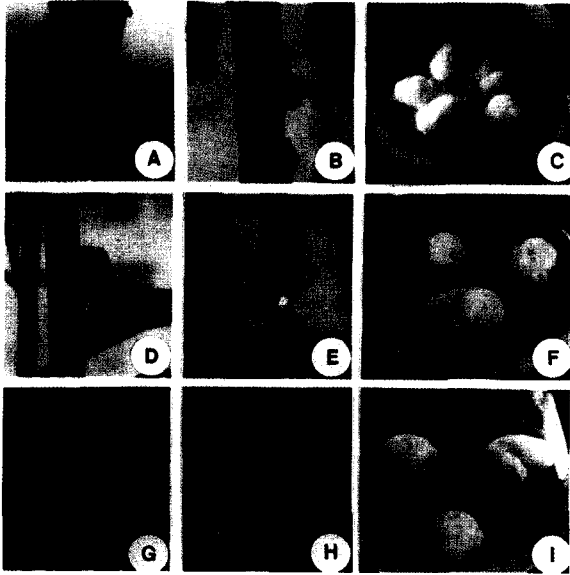


Figure 1. Phenotypes of crown gall tumor (A), teratoma (B) on *Nicotiana tabacum* stem infected by *Agrobacterium tumefaciens* C58, genetic tumor (D, G) and teratoma (E, H) on interspecific hybrid plants of *N. glauca* × *N. langsdorffii* (D, E), *N. langsdorffii* × *N. glauca* (G, H). Figures C, F and I are crown gall tumor callus cultured on hormone-free medium, genetic tumor callus of *N. glauca* × *N. langsdorffii* and *N. langsdorffii* × *N. glauca* cultured on 2,4-D 0.5 mg/L media, respectively.

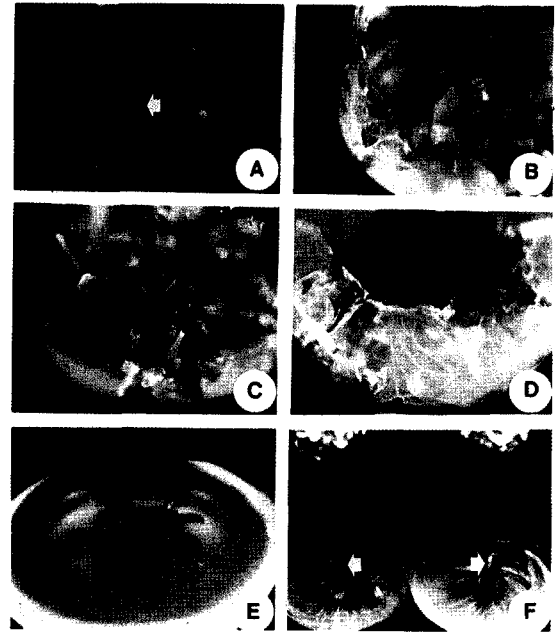


Figure 3. Teratoma shoot derived from genetic tumor tissue of *N. glauca* × *N. langsdorffii*. A, teratoma shoot (arrow) formed among the genetic tumor tissue on the phytohormone free medium; B and C, teratoma shoot grown like normal shoot; D, roots induced from teratoma shoot; E and F, teratoma shoots (F) were grown like normal shoot after 2 months culture of apical teratoma shoot (E).

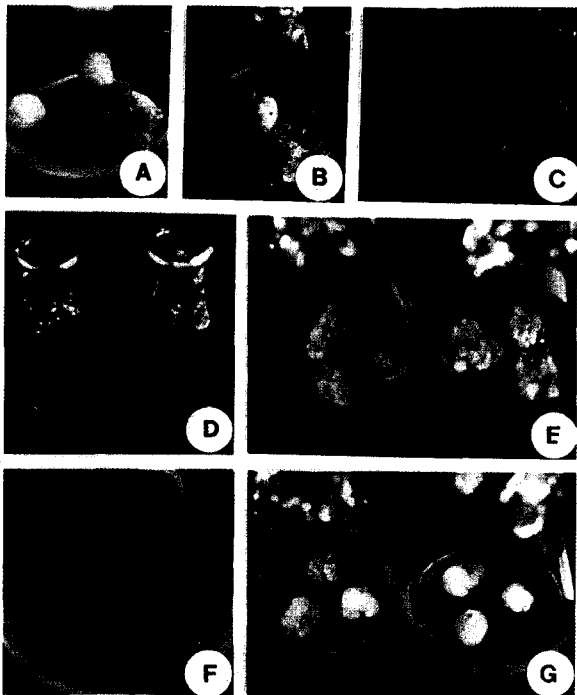


Figure 2. Phenotypes of crown gall tumor callus (A) and teratoma shoot (B, C) derived from crown gall of *Nicotiana tabacum* stem infected by *Agrobacterium tumefaciens* C58, and teratoma shoot (D, F) derived from interspecific hybrid plants of *N. glauca* × *N. langsdorffii* (D), *N. langsdorffii* × *N. glauca* (F). Figures, E and G are genetic tumor callus of *N. glauca* × *N. langsdorffii* (E) and *N. langsdorffii* × *N. glauca* (G) cultured on the MS medium with 2,4-D 0.5 mg/L, respectively.

teratoma shoot가 형성되었다 (Figures 2D, 2F). 그러나 이런 teratoma shoot의 일부를 절단하여 2,4-D가 0.5 mg/L 첨가된 배지에 접종하여 2~3회 계대배양하면 crown gall tumor callus와 같은 전형적인 callus가 형성되었다 (Figures 1F, 1I). 이런 결과는 crown gall tumor 조직과 genetic tumor의 조직이 형성되는 형태적 특성뿐만 아니라, 기내조직배양에서도 매우 유사한 현상을 보여 crown gall tumor와 genetic tumor 사이에 유전적인 유사성이 있음을 시사하고 있다.

한편 crown gall tumor callus는 식물호르몬 무첨가배지에서 계속적으로 계대배양할 경우 조직의 일부에서 teratoma shoot가 형성되는데 (Figure 2A), 이 조직을 다시 계대배양할 경우 대부분의 teratoma shoot로 발전하며 (Figure 2B), 다시 계대배양할 경우 지상부가 계속적으로 성장하지 못하고, 또한 뿌리를 전혀 형성하지 못하며 계속적으로 옆으로만 증식하는 전형적인 teratoma shoot가 형성되었다 (Figure 2C). 반면 *N. glauca* × *N. langsdorffii* (Figure 2D)와 *N. langsdorffii* × *N. glauca* (Figure 2F) 중간 잡종체에서는 공히 최초 식물호르몬 무첨가배지에서 crown gall tumor와는 달리 많은 teratoma shoot가 형성되었으며 오히려 형성된 genetic tumor를 2,4-D (5 mg/L)가 첨가된 배지에 다시 배양하면 식물호르몬 무첨가배지에서 성장한 crown gall tumor와 유사한 형태를 나타내었다 (Figures 2E, 2G). 그러나 genetic tumor 간에는 다소 형태적 차이가 있었는데, *N. langsdorffii*를 모본으로 한 잡종체에서는 둥그런 미색의 callus가 형성되었으나

(Figure 2G), *N. glauca*를 모본으로 한 잡종체에서는 callus 형태가 다소 울퉁불퉁하고 shoot가 형성될 것 같은 형태를 나타내었으며 색깔도 일부 녹색을 띄우고 있었다 (Figure 2E).

연초 teratoma shoot의 생장에 미치는 IAA, GA 및 active carbon의 영향

식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배지에서 형성된 teratoma shoot 중에서는 간혹 정상식물체와 같이 성장하는 개체를 발견할 수가 있었는데 (Figure 3A), 이런 개체를 분리하

여 다시 동일배지에 옮기면 정상식물체와 같이 생장이 가능하였으며 (Figure 3B, 3C), 뿌리를 가진 식물체로 생장을 하였다 (Figure 3D). 특히 뿌리를 가진 식물체의 정단부를 절단하여 다시 새로운 식물호르몬 무첨가배지에 배양하면 (Figure 3E) 정상적인 식물체로 성장하였으며 뿌리도 발육되었다 (Figure 3F). 그러나 계속 2개월 이상 배양을 할 경우 지상부의 가장 아랫부분에서 새로운 teratoma shoot가 많이 발생하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 3F).

이런 결과는 teratoma shoot의 경우에는 전혀 뿌리를 갖지 못하기 때문에 여러 teratoma shoot 중에서 새로운 식물체로 생각할 수 있으나, 다시 식물체의 아랫부분에서 많은 teratoma shoot를 생산한 것으로 보아 잡종체에서 shoot가 형성된 것임을 확인할 수 있었다. 따라서 teratoma shoot에 식물호르몬 및 active carbon을 첨가하여 teratoma shoot의 정상적인 생육상태를 조사하고자 우선 IAA의 농도를 0, 1, 3, 5, 7, 10 mg/L 첨가하여 광, 약광 및 암상태로 배양하였던 바, 생장이 농도간에 커다란 차이를 보이지 않았으나 광하에서 생체중이 가장 높았으며 그 다음에 암상태에서 양호하였으며 약광하에서는 생체중이 가장 낮았다 (Figure 4A). 특히 약광 및 광하에서는 shoot의 색깔이 녹색을 띄우고 있었으나 암상태에서는 모두 백화현상을 보였다 (Figure 4A). 또한 GA를 0, 10, 20, 30, 40 mg/L 첨가처리구에서는 shoot가 모두 침엽수처럼 뾰족한 상태로 생장이 되었으며 광하에서는 GA₃의 농도에 따라 생체중에 차이가 별로 없었으나 약광 및 암상태에서는 GA₃ 첨가구에서 오히려 감소되는 경향을 보였다 (Figure 4B). Active carbon을 첨가한 배지에서도 무첨가구에서 생체중이 더 높았으며 약광 및 암상태에서보다 광하에서 가장 높은 생체중을 보였다. 그러나 공히 teratoma shoot가 뿌리를 가진 정상적인 식물체로는 성장하지 못했다 (Figure 4C). 이상과 같이 crown gall tumor는 *Agrobacterium tumefaciens* C58의 Ti-plasmid에 의해서 형성되며 genetic tumor는 *Agrobacterium* spp.를 처리하지 않은 특수한 식물 중간 잡종체에서 형성되는 tumor로서 본 실험에서는 *Agrobacterium tumefaciens* C58과 *N. glauca*와 *N. langsdorffii*의 중간 잡종체에서 crown gall tumor와 genetic tumor를 유기하였다. Tumor조직이 형성되는 형태를 보면 매우 비슷한 양상을 띄우고 있어 서로 유전자간에 어떤 유사성이 있지 않은가 하는 의심을 갖게 한다. 뿐만 아니라 이 두 종류의 tumor조직을 절취하여 식물호르몬 무첨가배지에 접종하면 모두 왕성한 callus가 형성되었는데 crown gall tumor는 미색의 반구형의 callus를 형성하다가 많은 teratoma shoot를 형성하지만, genetic tumor 유래 teratoma shoot는 2,4-D 0.5 mg/L를 첨가하여 배양할 경우에는 crown gall tumor와 같이 미색의 반구형의 callus로 성장하였고 오히려 식물호르몬 무첨가배지에서 teratoma shoot를 형성하였다. 특히 genetic tumor로부터 유래된 teratoma shoot는 오히려 식물호르몬을 첨가함으로써 생장이 더욱 감

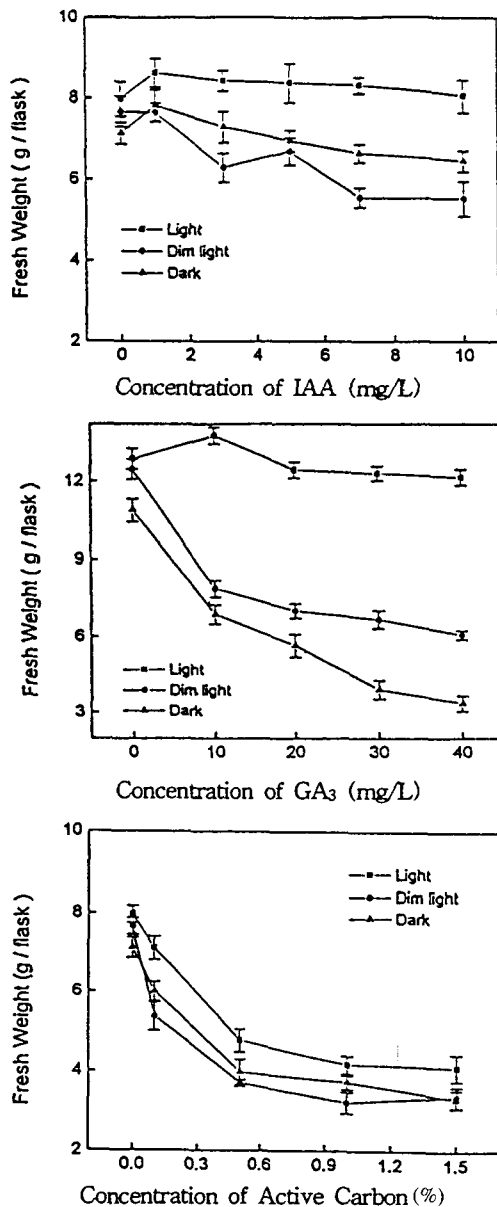


Figure 4. Effects of IAA, GA₃ and active carbon on the growth of teratoma shoot under bright light (9 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$), dim light (3 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$), and dark condition after 1 month of culture. Each bar represents the mean \pm SE of the fresh weight of 30 flasks.

소되어 자체내에서 성장할 수 있는 충분한 식물호르몬을 생산하고 있음을 간접적으로 시사하고 있으며, 이런 현상은 식물호르몬 자가합성 유전자를 함유하고 있는 crown gall tumor와 매우 비슷하여 genetic tumor 와 crown gall tumor 간에는 식물호르몬에 관한 유전적인 유사성을 가지고 있는 것으로 생각된다.

적 요

연초 crown gall tumor와 genetic tumor의 형성시 형태적 특성과 조직배양시 식물호르몬에 대한 반응을 조사하였다. Crown gall tumor는 *A. tumefaciens* C58을 감염시켜 형질전환된 tumor조직으로부터 획득하였으며, genetic tumor는 *N. glauca* (2n=24)와 *N. langsdorffii* (2n=18)의 중간교배에 의하여 유기된 잡종식물체에서 자발적으로 발생한 tumor조직으로부터 획득하였다. 형성된 crown gall tumor, genetic tumor 및 teratoma shoot의 형태적 특성은 매우 비슷하였으며, 식물조직배양시 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 기본배지에서 생장이 왕성하였다. Crown gall tumor는 식물호르몬 무첨가배지에서 전형적인 tumor callus가 형성되었으며 teratoma shoot도 형성되었다. 반면에 genetic tumor는 2,4-D 0.5 mg/L 첨가된 배지에서 tumor callus가 형성되었으며, 식물호르몬 무첨가배지에서는 많은 teratoma shoot가 형성되어 식물호르몬의 조절에 의해서 phenotype을 거의 비슷하게 할 수 있었다. Genetic tumor는 재분화시 정상적인 식물체보다는 뿌리를 갖지 못하는 teratoma shoots가 형성되는데 외부에서 인위적으로 식물호르몬인 IAA와 GA, 그리고 active carbon을 첨가하여 완전한 식물체를 생산하는 데는 실패하였다. 그러나 간혹 식물호르몬 무첨가배지에서 뿌리를 갖는 정상식물체로 성장하는 shoot가 형성되었는데 이런 식물체에서도 성장하면서 줄기부분에서 다시 genetic tumor가 형성되었으며, 잎절편을 다시 식물호르몬 무첨가배지에 접종할 경우에

도 teratoma shoots를 형성하였다.

인용문헌

- Black LM** (1965) Physiology of virus induced tumors in plants. *Encycl Plant Physiol* **15**:236-266
- Braun AC** (1953) Bacterial and host factors concerned in determining tumor morphology in crown gall. *Bot Gaz* **114**:363-371
- Caspary R** (1873) Eine Wruke (*Brassica napus* L) mit laubsp ossen auf knolligem wurzelausschlag. *Schr Phys Oekonom Ges Konigsb* **14**:109-112
- Ichikawa T, Syono K**(1988) TumORIZATION-redifferentiation system of tobacco genetic tumor. *Plant Cell Physiol* **29**:1373-1378
- Ichikawa T, Syono K**(1991) Tobacco genetic tumors. *Plant Cell Physiol* **32**:1123-1128
- Kostoff D** (1930) Tumors and other malformations on certain *Nicotiana hybrids*. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd* **81**:244-280
- Lim G, Burton JC** (1982) Nodulation status of the Leguminosae. In: "Nitrogen fixation" Broughton WJ (ed), Oxford university Press Oxford Vol. 2, pp 1-34
- Meyer J** (1982) Irrigation vasculaire dans les galles. *Mem Soc Bot Fr* pp 75-97
- Sharp WR, Gunckel JE** (1969) Physiological comparisons of pith callus with crown gall and genetic tumors of *Nicotiana glauca*, *N. langsdorffii* and *N. glauca-langsdorffii* grown *in vitro*. II. Nutritional physiology. *Plant Physiol* **44**:1073-1079
- Yang DC, Choi KT** (1991) Growth characteristics of teratoma shoot derived from crown gall callus of *Nicotiana tabacum* cv NC2326. *J Kor Soc Tob Sci* **13**:36-42
- Yang DC, Yoon ES, Choi KT, Lee JM** (1998) Formation of genetic tumor and characteristics of teratoma shoot from tobacco interspecific reciprocal hybrids. *Kor J Plant Tiss Cult* **25**:135-139

(접수일자 1998년 10월 8일)