

도마토 癌腫內 *Agrobacterium tumefaciens* 의動態에 對하여

*尹 權 相·李 敏 載·洪 淳 佑·河 永 七

(*서울大 敎養課程部·서울大 文理大)

Electron microscope study on
Agrobacterium tumefaciens in tomato tumor

YOON, Kwon Sang, Min Jai LEE, Soon-Woo HONG, and Yung Chil
HAH

(Seoul National University)

ABSTRACT

The tomato plant, *Lycopersicon esculentum* Mill. was inoculated with tumor inducing strain, A₆K₁, of *Agrobacterium tumefaciens* and its produced tumors were examined with the electron microscope.

A number of bacteria are usually detected in the intercellular region of the host plant, and it is observed that the host cytoplasm is readily destroyed in the region where the bacterial invasion occurred. Some of the bacteria in the host tissues are enclosed with the single unit membranes, in other locations lots of bacteroids were examined and the bacterial lysis is generally observed in those bacteroids.

The bacterial movement in the tumor tissue and some peculiar relationships between the pathogens and the host plant are discussed.

緒 論

植物體에 癌腫을 誘發하는 菌體로써 알려져 있는 *Agrobacterium tumefaciens*에 關한 報告는 1920 年代의 Riker(1923, 1926)等으로 부터 비롯되어 主로 癌腫을 誘發하는 自然狀態 및 人爲的條件에 對하여 研究가 集中되어 왔었다.

現在까지 報告된 몇 가지 論文의 結果에 依하면 *Agrobacterium*에 對한 植物體의 癌腫 誘發은 一般的으로 木栓化가 不完全한 어린 植物의 組織이나 特히 뿌리와 같이 柔軟한 組織에 용이하다고 하였으며 大部分의 경우 이들 病原菌은 一次進入路로써 植物體의 外

部傷處를 利用하므로 傷處의 크기 및 菌體의 數가 癌腫의 크기에 決定的인 役割을 한다고 하였다(Berthelot, and Amoureux, 1936; Hildebrant, 1942; Link *et al.*, 1953; Klein and Klein, 1952).

癌腫誘發의 原因을 究明키 爲해 行해졌었던 一連의 研究報告中 가장 興味를 끌었던 것은 癌腫組織이 正常組織에 比하여 多量의 auxin을 含有하고 있다는 事實이다(Henderson and Bonner, 1952; Klein and Vogel, 1956). 以上과 같은 auxin의 多量蓄積에 關한 問題는 Platt(1954)에 依하여 그 윤곽이 밝혀진 것으로 이들은 癌腫組織의 경우 正常組織에 比하여 auxin oxidase의 activity가 훨씬

* 著者 等은 本 研究를 遂行하는 데 있어 手酷을 아끼지 않은 서울大學校 文理科大學 植物學科 朴敏哲氏에게 感謝의 뜻을 表하는 바이다.

신 微弱하다는 것을 發見하였으며 그후 Lipetz (1959)는 auxin의 生産은 全的으로 植物體에 依한 것이지만 *Agrobacterium*에 感染되는 경우 植物體의 auxin oxidase의 生合成이 크게 저해를 받게 되어 이와 같은 auxin의 多量蓄積現象이 發生하는 것으로 밝혔다.

以上에서와 같이 *Agrobacterium*에 依한 植物體의 癌腫에 關한 研究는 이의 誘發條件 및 癌腫組織에 對한 物質의 動態에 局限되어 있는 反面 癌腫組織 特有의 細胞學的 研究에 對한 報告는 全無한 形便이다. 이에 著者等은 *Agrobacterium tumefaciens*에 依하여 도마도에 誘發된 癌腫組織의 細胞學的 研究를 行하던 中 그 一部로써 菌體의 組織內 動態에 關한 몇 가지 事實을 報告하고자 한다.

材料 및 方法

*Agrobacterium tumefaciens*를 도마도줄기에 接種하여 誘發된 癌腫을 電子顯微鏡으로 調査하였다.

도마도 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 種子를 20~25°C의 溫室에서 發芽시킨 후 2週後 第2節間의 表皮에 兇된 面刀날을 써서 約 1 mm²의 傷處를 만든 後 菌을 接種하여 liquid paraffin으로 封하였다. 接種에 使用된 菌株는 *Agrobacterium tumefaciens* A₆K₁으로써 dextrose nutrient agar medium (Difco, 1953)을 써서 28°C에서 24時間 培養한 後 發生된 菌의 集落을 inoculum으로 使用하였다. 接種 5日 後에 肉眼으로 觀察하여 確認된 癌腫을 切取하여 3% glutaraldehyde (in 0.1M phosphate buffer, pH 7.3)를 써서 4°에서 8時間동안 前處理를 行한 後 2% osmium tetroxide (in 0.1M phosphate buffer)로써 4°에서 2時間동안 固定했다. 固定된 組織片은 Alc-Ace series에 의해 脫水시킨 後 Epon mixture를 써서 resin infiltration을 行한 後 60°에서 3日동안 重合化시켰다.

Epon mixture: Epon 812, 20.3ml; DDSA, 6.3ml; MNA, 11.1 ml

Hardening accelerator: DMP, 0.56 ml

電子顯微鏡觀察用 超薄片은 glass knife를

使用하여 LKB-ultratom III로써 製作하였으며 電子染色은 saturated uranyl acetate (in 50% alc.)液 或은 lead citrate를 써서 JEM-T7 電子顯微鏡으로 25 KV 或은 60 KV의 加速電壓下에서 觀察하였다.

結果 및 考察

癌腫組織內에서 觀察되는 菌體의 存在는 一般의인 推則과는 달리 癌腫發生의 初期段階에서만 觀察될 뿐 完全히 發達된 癌腫에서 는 確認되지 않았다.

菌體의 組織內動態를 밝히기 爲하여 行해진 本 研究에서는 接種 5日 後에 採取된 發生初期의 癌腫과 約 3週 後에 採取된 完全히 發達된 癌腫을 材料로 썼으나 後者에 關한 結果는 本 報告에 包含시키지 않았다.

發生初期의 癌腫을 觀察한 結果 밝혀진 가장 特徵의인 現象은 菌體가 主로 intercellular region에서 發見되는 것으로 密集된 菌體가 比較的 弱電子密度를 나타내는 matrix內에 埋沒되어 있고 host cell wall은 肥厚된 狀態를 보이고 있으며 (Fig. 1, 2) 또 다른 경우는 異常擴大된 intercellular region에 菌體가 分散되어 있음이 觀察되었다 (Fig. 3).

이와 같은 intercellular region에서의 菌의 存在에 對해서는 콩科 植物의 root nodule內에서 *Rhizobium*이 이와 같은 性質을 가지고 있다는 報告가 (Noju, 1967) 있으나 root nodule에 對한 大部分의 報告는 intercellular region이 아닌 特異한 invagination인 'infection thread'를 形成하여 內部에 菌體가 包含되어 있고 이것이 아울러 菌體의 intercellular movement에 對한 carrier로써 利用된다고 報告하였다 (Bergersen *et al.*, 1958; Jordan *et al.*, 1963; Dart *et al.*, 1966; Goodchild *et al.*, 1966). 여하튼 intercellular region內의 菌體의 存在問題는 *Agrobacterium*의 特徵의인 現象이 아닌가 생각된다.

癌腫組織內에 存在하는 菌體는 가끔 single enclosing membrane에 依하여 둘러싸여져 있는 것이 觀察된다 (Fig. 4). Host tissue內에서 enclosing membrane에 둘러싸여져 있

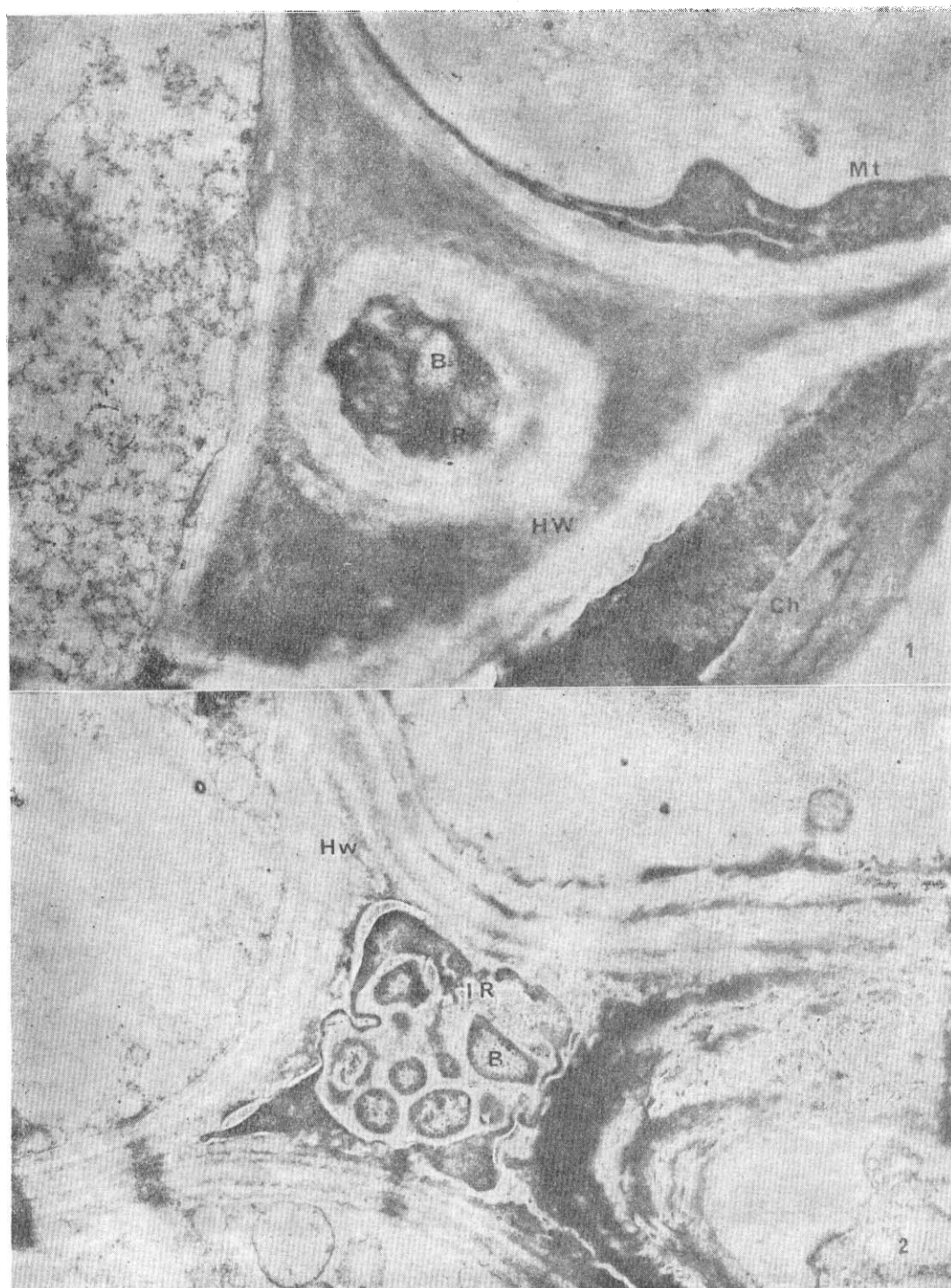


Fig. 1 and 2. Intercellular regions containing a group of bacteria. Bacteria (B) surrounded with a thickened host cell wall(HW) are seen. IR: Intercellular region. Ch: Chloroplast. Mt: Mitochondria. $\times 12,830$, $\times 9,910$

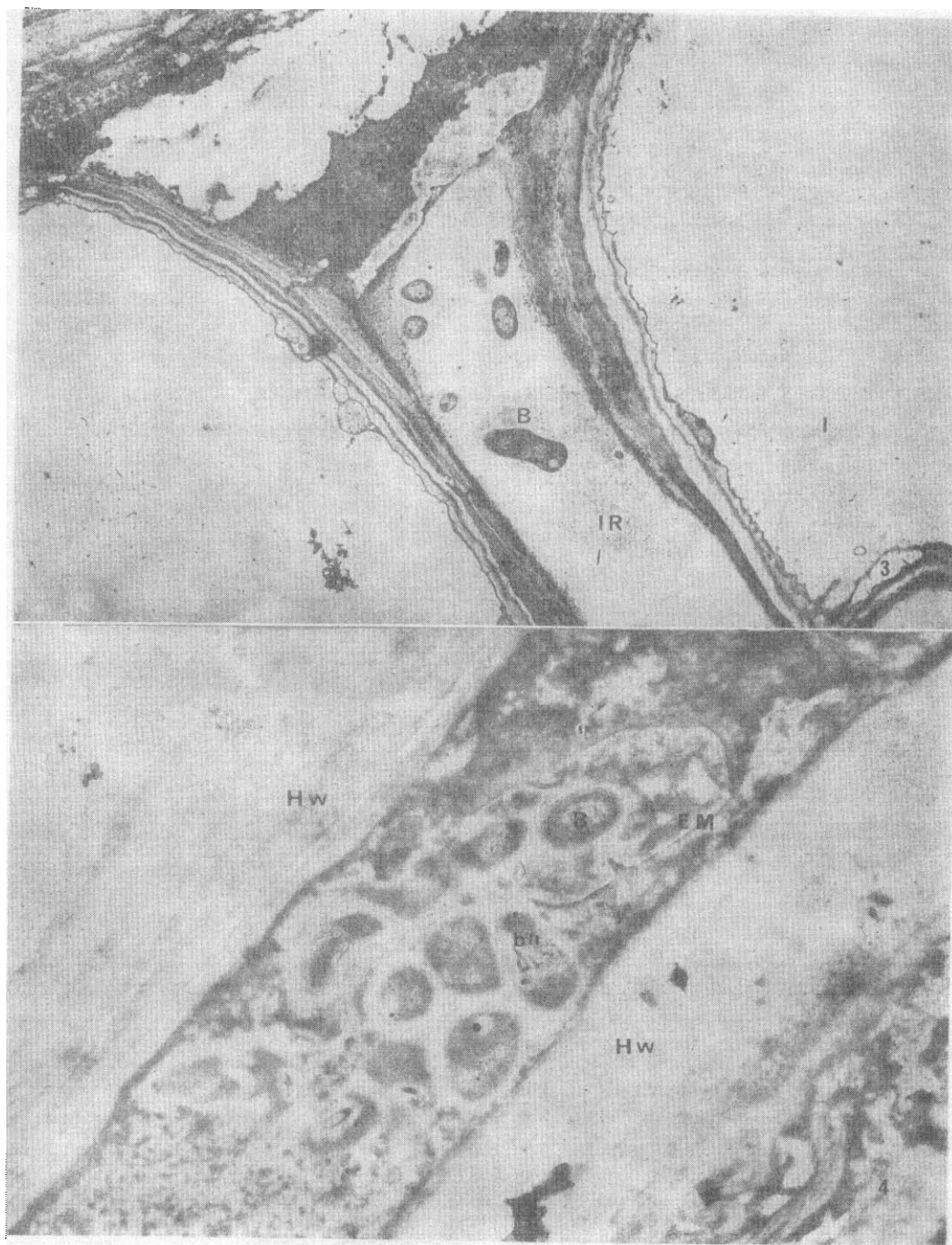


Fig. 3. Extremely widened intercellular region containing a few bacteria. B: Bacteria. IR: Intercellular region. $\times 7,170$

Fig. 4. A group of bacteria enclosed within a thin membrane in the intercellular region. B: Bacteria. EM: Enclosing membrane. HW: Host cell wall. bn: Bacterial nuclear material. $\times 12,130$



Fig. 5. Invagination containing some bacteria. IW: Invagination wall. B: Bacteria. HW: Host cell wall. $\times 5,290$

Fig. 6 and 7. A number of bacteria diffused around the ruptured invagination. Some of bacteria(B) enclosed within a thin membrane(EM) seem being released through the ruptured invagination wall(IW). $\times 8,160$. $\times 10,830$

Fig. 8. Abnormally thickened host cell wall(HW) and bacteroids(BD). $\times 6,400$



Fig. 9. Development of bacteria was almost ceased. Most of bacteria are transformed into bacteroids which typically have electron translucent granules. Some of bacteroids are showing partially lysed state. l: Lysed region. $\times 10,430$

Fig. 10. High magnification of bacteria. Filamentous nuclear material and several osmiophilic granules are apparently observed. EM: Enclosing membrane. B: Bacteria. HW: Host cell wall. $\times 15,740$

Fig. 11. Highly thickened host cell wall. Some bacteroids show apparent nuclear material(bn), while the others show bacteroid(BD) types. HW: Host cell wall. $\times 8,300$

는 菌體에 對한 研究는 亦是 root nodule bacteria에서 報告되어 있으며 特히 Jordan 等 (1963)은 *Rhizobium meliloti*를 *Du Puit alfalfa*에 接種시켜 誘發시킨 root nodule에 對한 報告에서 이를 double membrane을 報告하였으나 大部分의 경우는 亦是 single membrane으로써 알려져 있다(Bergersen *et al.*, 1958; Jordan *et al.*, 1963; Kidby *et al.*, 1966).

菌體의 host cytoplasm內 進入에 對한 一次的인 證據는 host cell과 連結된 invagination 形成에서 觀察되며(Fig. 5) 菌體를 包含하고 있는 invaginated sac은 어떤 時期에 cellulose wall이 파괴되므로써 菌體가 cytoplasm內로 擴散되는(Fig. 6, 7)것으로 보인다.

癌腫組織內에서 發見되는 菌體의 形態는 一般的으로 rod form으로써 nuclear region은 filamentous material로 이루어져 있으며 몇 개의 osmium 球가 菌體의 細胞質內에 分散되어 있다(Fig. 4, 6, 7, 10, 11). 그러나 어떤 部分에서는 nuclear region이 不確實해지고 electron translucent(vacuole 形態)部位가 發達한 bacteroid 狀態를 나타내며 菌體의 形態는 rod type이 아닌 여러가지 形態를 나타내고 菌體의 部分에 따라서는 lysis 現象을 보여주고 있다(Fig. 8, 9). 肥大組織을 誘發하는 土壤細菌中에서 *Agrobacterium*은 *Rhizobium*과는 달리 nitrogen fixation 能力이 없는 完全한 parasitic life cycle을 가진 細菌이지만 菌體의 形態나 habitat로 볼 때 *Rhizobium*과 類似한 點이 많다. *Rhizobium*에 의하여 誘發된 콩科 植物의 nodule에 關한 電子顯微鏡的 研究는 多數에 이르고 있으나 *Agrobacterium*에 의한 tumor에 對한 報告는 전혀 없는 形便이다.

本 實驗에서 밝혀진 가장 注目할 만한 現象中의 하나는 完全히 發達된 癌腫內에서 菌體의 存在가 確認되지 않고 發生初期의 癌種에서만 菌體가 確認되는 事實로, 이와 같은 事實은 host tissue內에서의 菌體의 inte-

rcellular movement가 比較的 容易치 않음을 暗示해 준다. 特히 菌體가 發見되는 部位의 細胞들은 거의 細胞質이 消失되어 있는 反面에 콩科 植物과 共生關係에 있는 nodule bacteria는 host cytoplasm內에서 cell organelles와 함께 包含되어 있어 이들 兩者는 좋은 對照를 이루고 있다(Bergersen *et al.*, 1958; Jordan *et al.*, 1963; Kidby *et al.*, 1966; Goodchild *et al.*, 1966).

組織內에서 發見되는 多數의 菌體가 IR (intercellular region)에서 觀察되는 事實로 미루어 菌體의 intercellular movement는 一次的으로 IR을 通하여 이루어 지는 것이 아닌가 推測되며 IR에서 多數의 菌體가 發見되는 事實과 함께 이 部位의 異狀擴大問題는 많은 疑問點을 提示해 주는 것으로 IR 部位의 物質으로써 잘 알려져 있는 pectic substance의 存在를 前提로 한다면 이의 擴大는 결국 pectic substance를 分解하는 pectic enzyme의 作用에 의한 結果로써 假定 할 수도 있으나 아직 IR의 溶解機作에 對한 어떠한 事實도 알려져 있지는 않다.

Soil bacteria에 의한 polygalacturonase (pectic enzyme)의 分泌에 關한 研究는 Ljunggren 等 (1961)에 의하여 콩科 植物의 root nodule에서 報告된바 있으며 nodule에 있어서의 polygalacturonase는 菌體가 分泌하는 어떤 特異한 物質의 자극에 의하여 host plant가 多量의 polygalacturonase를 生産할 수 있음을 報告한 바 있다. 한편 Galston 等 (1960)은 植物組織에 對한 macerating fluid로써 bacteria가 分泌하는 pectic enzyme에 關한 研究를 行하던 中 多量의 pectic enzyme으로써 植物組織을 處理한 結果 IR의 溶解에 의한 cell isolation 現象과 아울러 細胞의 致死現象을 發見한 바 있다. 以上과 같은 몇 가지 研究結果에 對한 報告들은 著者等に 의하여 本 實驗에서 觀察된 바 있는 host cytoplasm의 消失現象 및 IR substance의 溶解現象 등과 어떠한 連關性을 內包하고 있는 것 처럼 보이니 이에 對한 確實한 記據를 얻

기 爲해서는 癌腫組織의 pectic enzyme에 關한 生化學的 研究가 先行되어져야 한다고 생각된다.

癌腫組織에서의 host cell wall의 肥厚現象은 pink root fungus로 알려져 있는 *Pyrenochaeta terrestris*에 의하여 感染된 양파의 뿌리(Hess, 1969)를 비롯하여 root nodule에서 一般的으로 報告되어 있다. 그러나 本 研究에서 觀察된 바와 같이 host cell wall의 肥厚現象이 菌體와의 接觸部位로부터 적어도 5~6層 떨어진 細胞列에서 나타나는 것은 결국 細胞質이 파괴된 細胞에서는 2次 肥厚가 不可能함을 間接적으로 시사하는 것으로 以上과 같은 細胞膜의 異常肥厚는 結果적으로 菌體의 繼續적인 移動을 저지 할 수 있는 protecting barrier로서의 役割을 하는 것이 아닌가 推測된다.

Host cell에 對한 菌體의 進入問題는 癌腫誘發現象을 規明하는데 있어서 가장 重要한 問題中の 하나이다. *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 最初의 感染이 host plant의 傷處部位를 通하여 이루어짐은 잘 알려진 事實이나 host cell wall을 통한 cytoplasm內로의 進入問題는 結果적으로 host cell의 遺傳學의 特異성에 影響을 가져올 可能性이 있는 重要한 問題로써 이에 對한 報告는 全無한 形便이다. 本 實驗에서 밝혀진 菌體의 細胞質內 進入은 一次的으로 菌體를 包含하는 invaginated sac의 形成이 일어난 다음 어떠한 時期에 cytoplasm과 面한 sac의 cellulose膜이 파괴되므로써 菌體가 細胞質로 分散되는 것으로 推測되나 事實上 어떠한 경위에 의하여 이와 같이 膜이 파괴되는지에 對해서는 아직 밝혀지지 않고 있다.

感染된 組織內에서 發見되는 菌體의 enclosing membrane에 對한 報告는 主로 bacteria

에 局限되어 있는 것으로 Chapman(1959)等은 *Mycobacterium*에 의하여 感染된 생쥐의 spleen에서 이와 같은 膜構造를 報告하였으며 *Rhizobium*에 對해서도 이에 對한 研究結果가 報告되어져 있다(Bergersen and Briggs, 1958; Dart and Mercer, 1966). 特히 Jordan等(1963)은 이를 2重膜構造로써 host cell의 endoplasmic reticulum의 一部分이라고 하였으나 著者 등이 觀察한 癌腫組織內의 菌體의 enclosing membran은 明確한 單一膜으로써 特히 IR에 存在하는 菌體에서조차 이와 같은 膜構造가 觀察되는 것으로 미루어 적어도 *Agrobacterium*의 경우는 endoplasmic reticulum과 何等の 關聯이 없는 菌體自身の 것이 아닌가 思料된다.

Bacteroid에 關한 問題는 일찍이 Almon(1933)에 의하여 報告된 바 있으며 一般的으로 膜構造가 不完全하고 正常培地에서도 增殖能力을 回復할 수 없는 不安定한 狀態의 bacteria로써 알려져 있다. *Rhizobium*에서 報告된 bacteroid의 存在와 함께 本 實驗에서 觀察된 bacteroid問題는 興味있는 問題點을 提示하고 있으며 Dart等(1966)이 *Vigna*, *Acacia*, *Viminaria* 등에서 報告한 root nodule의 bacteroid는 本 實驗의 境遇와 거의 類似한 形態를 보여 주고 있다. 特히 bacteroid가 나타내고 있는 electron translucent region이 一種의 vacuole인지 或은 어떤 後生物質인지에 關해서는 전혀 알려져 있지 않지만 菌體의 部分的인 lysis가 明確히 觀察되는 事實을 念頭に 둔다면 host tissue內에 있어서의 *Agrobacterium*의 translocation은 假說的인 protecting barrier問題와 함께 確實히 어떤 限界의인 要因에 의하여 支配되는 것으로 생각된다.

摘

要

癌腫誘發性 *Agrobacterium tumefaciens* A₆K₁을 도마드 줄기에 接種시킨 後 誘發된 癌腫組織을 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

癌腫內에서의 菌體의 存在는 主로 intercellular region에서 確認되었으며 菌體에 感染된 host cell은 一般的으로 細胞質이 消失되는 傾向을 보였고 host cell wall은 部分的으로 甚한 肥厚現象을 나타내었

다. 菌體는 종종 single unit enclosing membrane에 의하여 싸여져 있으며 部位에 따라서는 多數의 bacteroid가 發見되는 것과 아울러 部分的인 菌體의 lysis 現象이 觀察되었다.

本 研究에서는 以上에서 記述된 바와 같은 癌腫組織內의 菌體의 動態에 對한 몇 가지 問題에 對하여 論議하였다.

引 用 文 獻

1. Almond, L. 1933. Concerning the reproduction of bacteroids. *Zbl. Bakt.* 87:289.
2. Bergersen, F. J., and M. J. Briggs. 1958. Studies on the bacteroidal components of soybean root nodules: Cytology and organization in the host tissue. *J. Gen. Microbiol.* 19: 482-492.
3. Berthelot, A., and G. Amoureux. 1936. Sur les tumeurs obtenues par inoculation de *Bacterium tumefaciens* à des plantules et des jeunes plants cultivée aseptiquement. *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris* 203: 629-631.
4. Chapman, G. B., J. H. Hanks, and I. H. Wallace. 1959. An electron microscope study of the disposition and fine structure of *Mycobacterium lepraemurium* in mouse spleen. *J. Bacteriol.* 77: 205-211.
5. Dart, P. J., and E. V. Mercer. 1966. Fine structure of bacteroids in root nodules of *Vigna sinensis*, *Viminaria juncea*, and *Lupinus angustifolius*. *J. Bacteriol.* 91: 1314-1319.
6. Galston, A. W., and W. K. Purves. 1960. The mechanism of action of auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 11:239.
7. Goodchild, D. J., and F. J. Bergersen. 1966. Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. *J. Bacteriol.* 92: 204-213.
8. Henderson, J. H. M., and J. Bonner. 1952. Auxin metabolism in normal and crown gall tissue of sunflower. *Amer. J. Bot.* 39: 444-451.
9. Hess, W. M. 1969. Ultrastructure of onion roots infected with *Pyrenochaeta terrestris*, a fungus parasite. *Amer. J. Bot.* 56: 832-845.
10. Hildebrand, E. M. 1942. A micrurgical study of crown gall infection in tomato. *J. Agric. Res.* 65: 45-49.
11. Jordan, D. C., I. Grinyer, and W. H. Coulter. 1963. Electronmicroscopy of infection threads and bacteria in young root nodules of *Medicago sativa*. *J. Bacteriol.* 86: 125-137.
12. Kidby, D. K., and D. J. Goodchild. 1966. Host influence on the ultrastructure of root nodule of *Rupinus luteus* and *Ornithopus sativus*. *J. Gen. Microbiol.* 45: 147-152.
13. Klein, R. M., and D. T. Klein. 1952. Effects of maleic hydrazide on initiation and development of tomato crown gall tumors. *Amer. J. Bot.* 39: 727-730.
14. Klein, R. M., and H. H. Vogel, Jr. 1956. Necessity of indolacetic acid for the duplication of crown gall tumor cells. *Plant Physiol.* 32: 129-135.
15. Link, G. K. K., H. W. Wilcox, V. Eggers, and R. M. Klein. 1953. Role of nitrate-nitrogen nutrition in growth of tomato and crown gall. *Amer. J. Bot.* 40: 436-444.
16. Lipetz, J. 1959. A possible role of IAA oxidase in crown gall tumor induction. *Nature* 184: 1076-1077.
17. Ljunggren, H., and G. Fahraeus. 1961. The role of polygalacturonase of root hair invasion by nodule bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 26: 521-528.

18. Noju, M. 1967. Electron microscopy of soybean nodule cell. *The Bulletin of Shimane Agricultural College* 15: 9-14.
19. Platt, R. S. Jr. 1954. The inactivation of auxin in normal and tumorous tissues. *Année Biol.* 30: 349-359.
20. Riker, A. J. 1923. Some relations of the crown gall organism to host tissue. *J. Agric. Res.* 25: 119-132.
21. Riker, A. J. 1926. Studies on the influence of some environmental factors on the development of crown gall. *J. Agric. Res.* 32: 83-96.