

植物의 癌腫誘發에 關한 研究 (第3報)

Bacteria-free 癌腫組織의 獲得에 있어서 抗生劑의 效果

李 敏 載·洪 淳 佑·崔 榮 吉

(서울대학교 文理科大學 植物學科)

Studies of plant Tumor induction (III)

Antimicrobial action of some bacteriacidal agents to obtain Bacteria-Free Tumor tissue

Lee, Min Jai., Hong, Soon Woo., and Choi, Yong Keel.

(Department of Botany, Seoul National University)

Abstract

Up to the present time, there are only three methods by which we can obtain bacteria free crown gall tissue. According to some papers related to this field, the first method is based on the works of Braun('53) who maintained infected plants at 46--47°C for several days. But the method has a problem that very few plants can tolerate this temperature. The second method is based on the well known observations that old tumors appear to be bacteria free at least 1 or 2% of the explants. Also this method is known to us as laborious and time consuming.

The third method is the one we were using that was attempting to kill the bacteria with bacteriacidal agent such as Antibiotics. In fact, it is reported that almost complete control of crown gall of tomato was obtained by Blanchard('51) when plants were grown in a nutrient containing Aureomycin(20µg/ml) following needle puncture with the gall bacteria. We have been engaged in making the experiment by applying solution of Penicillin, Streptomycin and of Chloramphenicol(Succinate free) to find the strong bacteriacidal agent through the method of disc plate, and to confirm the effect of antimicrobial action through the method of plant tissue culture system without possible injury to the host plant.

The result of this report is the fact that the strongest bacteriacidal agent among the above three Antibiotics was Chloramphenicol(Succinate free 1000 p.p.m). and that there happened no injury to the tissue cultures in a White's 10 X media containing 1000 p.p.m. of Chloramphenicol.

緒 論

植物體의 傷處部位에서 癌腫을 이끄는 *Agrobacterium tumefaciens*를 癌腫組織으로부터 除去하는, 이른바 bacteria-free 狀態의 癌腫組織을 얻는 方法으로서는 現在까지 세가지 方法이 알려져있다. 그 첫

째는 일찍이 Braun('47)이 試圖한바 있는 熱處理方法으로서 46~47°C의 溫度下에서 bacteria에 感染된 癌腫組織을 3~4日間 放置해 줌으로서 bacteria-free한 組織을 얻었다는 것인데, 이 方法은 實際로 그러한 高溫下에 極少數의 植物만이 살아 남을 수 있다는 問題를 內包하고있다. 두번째의 方法으로서

는老衰한 癌腫組織에는 1~2%程度 스스로 bacteria-free 한 組織이 된다는 것인데 이 또한 時間과 經濟的인 面에서 여러가지 實驗的 곤란을 주고있다.

세번째 方法은 bacteriacidal 한 物質을 癌腫組織에 處理해 주는것이다. 지금까지 그러한 物質이 bacteria를 致死시키는 效果를 보여준것은 事實이나 宿主植物組織에게도 傷害效果를 줄수있는 可能性으로 因하여 이方法 또한 忌避되어 왔으나 Brown, Boyle ('45), Hampton('48)등은 Streptomycin 및 Penicillin을 Crown gall에 處理하여 tomato를 包含한 6屬의 植物을 殺劑했다는 報文과 Blanchard('51)가 20µg/ml의 Aureomycin을 包含한 nutrient solution에서 tomato에 誘發된 Crown-gall을 培養하여 Crown-gall의 control을 얻었다는 事實은 本人들에게는 세번째의 方法이 가장 容易한 方法이라고 確信되었다.

여러가지 實驗目的에 따른 bacteria-free 한 癌腫組織을 얻고자 本人들은 上記 Streptomycin과 Penicillin 및 Chloramphenicol(succinate free)을 Agrobacterium tumefaciens의 몇몇 strain에 處理하여 가장 致死效果가 큰 Antibiotics와 그의 最適濃度를 求하여 宿主植物組織에게도 아무런 傷害效果를 보여주지 않음을 確認코져 植物組織培養法을 導入했다.

材料 및 方法

(1) 菌種 : Agrobacterium tumefaciens

- strain A₆K₁
- " B₆
- " 11BNV₆
- " 11BV₇
- " T₃₇

(2) 培地 : Dextrose Agar Nutrient(Difco. '53)

(3) Antibiotics: Streptomycin, Procain G Penicillin, Chloramphenicol(Succinate free)

上記 다섯가지 strain을 24時間 Dextrose Agar Nutrient에서 培養(30±°C)하여 다시 Petri Dish에 同一한 培地로서 接種시킴과 同時에 直徑 6mm의 filter paper(Un. 1Pk)에 濃度別로 Antibiotics를 희석한 溶液을 吸收시켜 培地위에 올려놓은後 30±°C의 incubator속에서 培養하였다. 24, 48時間別로 形成되는 filter paper 주위의 阻止帶를 測定하여 bacteria에 對한 Antibiotics의 致死效果를 觀察하였다. (Disc Plate method). filter paper 주위에 圓形으로 形成된 阻止帶의 半徑을 길이 3mm 當(+)로, 3mm 以下를 (-)로 記錄하였으며, 最適濃度로 구하여진 Antibiotics를 正常의 tomato를 材料로한 組織培養

器에 適用시키기로 하였다.

結果 및 考察

다섯가지 strain에 對한 3種의 antibiotics의 致死效果는 다음과같다. table 1.은 Streptomycin을 處理한 結果를 얻은 것을 나타낸 것이며, 結果는 가장 Virulent한 A₆K₁의 경우 150P.P.M.에서 ++의 效果를 果여 주었을뿐 나머지 strain에서는 全然 阻害效果를 나타내지 않았다.

Table 1. Antimicrobial Action of Streptomycin to Agrobacterium tumefaciens. Effects of the Antibiotics appeared only in case of A₆K₁ strain on 1000~1500 P.P.M.'s Concentration.(Average of 3 replicates)

Strain Hour Conc. (ppm)	A ₆ K ₁		B ₆		T ₃₇		11 B NV ₆		11 B V ₇	
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
1500	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: (+) means the marginal distance, 3 mm from filter paper. Antibiotics was absorbed by filter paper with 6mm's diameter. (-) means the distance below 3 mm from the margin of filter paper.

table 2의 Penicillin에 대한 阻害效果는 1500~2000 P.P.M.에 이르러 處理後 24時間만에 ++, 혹은 +의 阻止帶를 形成하였으나 48時間부터 점차로 阻止帶를 상실해 가는 結果를 보여준다.

Table 2. Antimicrobial action of Penicillin (Hostacillin. Procaine penicillin G) to Agrobacterium tumefaciens. Similar to the Streptomycin, it's effect to the bacteria appeared on 1500~2000 PPM's Concentration. But the effects gradually decreased after 24 hours. (Average of 3 replicates)

Strain Hour Conc. (ppm)	A ₆ K ₁		B ₆		T ₃₇		11 B NV ₆		11 B V ₇	
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1500	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
2000	++	++	+	-	+	-	++	+	-	-

그러나 Succinate-free 의 Chloramphenicol 을 處理 後 주었을 때에는 table 3 에서 보는 바와 같이 強力한 致死效果를 보여주었다.

특히 A₆K₁ 의 경우 100 P.P.M.에서부터 致死效果를 보이기 始作하여 1000 P.P.M.에 이르러서는 모

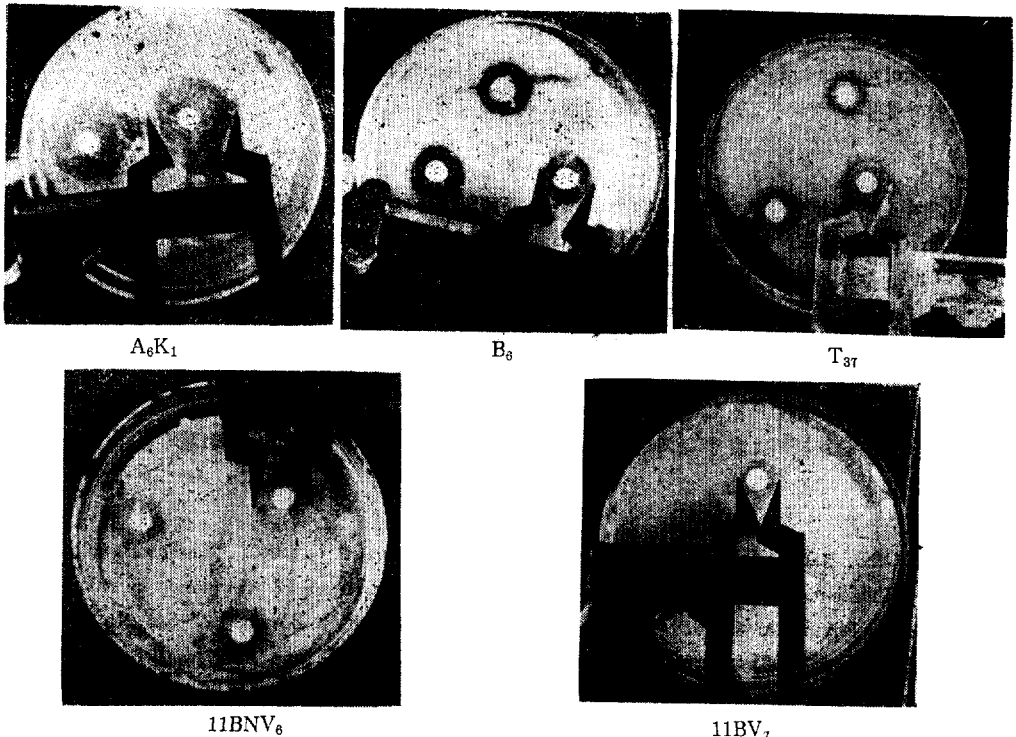
든 strain 에서 顯著한 致死效果를 나타내고 處理後 48 時間까지 阻害效果가 持續되었다. 2000 P.P.M.에서 A₆K₁의 경우(一)의 現象을 보여준 事實은 特異한 一例였다.

Table 3. In case of Chloramphenicol, (succinate free) killing effects were seen from the Concentration of 100 P.P.M. in all strains and the maximum effect to bacteria was seen on 1000 PPM's Concentration. After 1000 P.P.M's Concentration, the effects gradually decreased and about on 2000 PPM, antimicrobial action was not seen in case of A₆K₁(Average of 3 replicates)

Conc. Hour (ppm)	A ₆ K ₁		B ₆		T ₃₇		11BNV ₆		11BV ₇	
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
100	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
200	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-	-
400	++++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
500	++++	+++	++	+	++	+	++	+	+	-
800	++++	+++	++	+	++	+	++	-	+	+
1000	++++	+++	++	+	++	+	+	+	++	++
1500	++	++	++	+	++	-	+	+	+	-
2000	-	-	++	++	++	-	+	+	+	-

1000 P.P.M. 以後는 急激히 阻害效果가 減少하기 始作하여 2000 P.P.M.에 이르러 低濃度에서 볼수있는 結果와 同一하게 나타남다. Fig 1. 2. 3. 4. 5. Measurement for Antimicrobial action of Chloramp-

henicol to the various strains of *Agrobacterium tumefaciens*. These photographs were obtained 24 hours after treatment of Chloramphenicol (Succinate free).



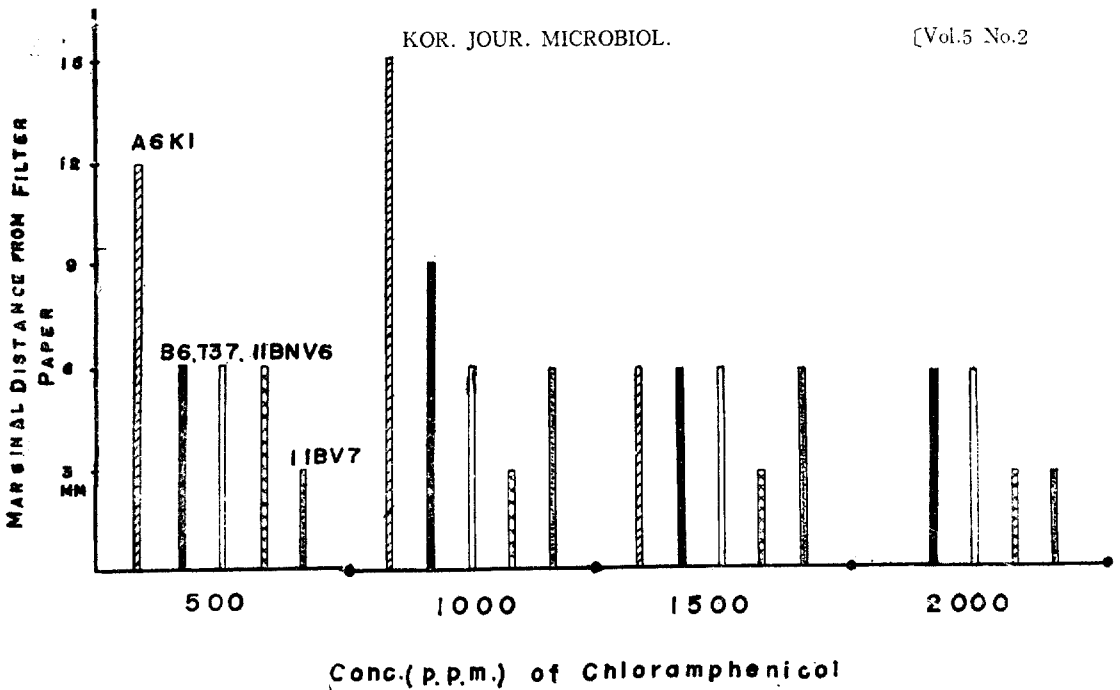


Fig 6. This chart represents the results obtained from tabel 3. Like the table 3, this charts shows the antimicrobial action of Chloramphenicol on each concentration 24 hours after treatment. We can easily find out the fact that the most suitable concentration to kill all the strains is 1000 PPM's concentration.

table 3에서 나타난 最適濃度 1000 P.P.M의 植物體에 미치는 阻害效果의 有無를 檢證하기 위하여 White 氏의 10 X Agar Media(50 cc)에 1000 P.P.M.濃度の Chloramphenicol 0.5 cc를 注入하여 正常의 도마도줄기에서 切斷해낸 切片을 材料로 組織培養

을 實施한 結果는 아무런 阻害를 培養體에 보이지 沒이 培養이 可能했다. 따라서 本人들은 Chloramphenicol 1000 P.P.M. 濃度로서 癌腫組織에 處理하여 bacteria-free의 癌腫組織을 얻을 수 있음을 確認하였다.

摘 要

여러가지 實驗目的에 따르는 bacteria-free의 癌腫組織을 얻고져 3種의 Antibiotics, 즉 Streptomycin, Penicillin (Procaïn G), Chloramphenicol (Succinate free)를 daper disc plate method에 適用하여 얻은 結果를 다음과 같이 整理할 수 있다.

3種의 Antibiotics 中에서 Streptomycin 보다는 Penicillin 이 gall bacteria의 致死에 効果的이나, Penicillin 보다 더욱 強力한 것으로는 Chloramphenicol Succinate free로 判斷되었으며 1000 P.P.M.濃度에서 모든 bacteria strain 에게 顯著한 致死作用을 보여준다음 그 以後부터는 效果가 減少하기 始作했다.

本實驗에서 얻은 1000 P.P.M.濃度の Chloramphenicol 이 宿主植物에게도 어떤 有害한 作用이 없는가를 알아보기 爲하여 組織培養體에 適用한 結果는 아무런 阻害效果를 보여줌이 없이 組織培養이 可能했다.

References

- Allen, O.N., Riker, A.J., and Klemmer, H.W. 1955 Inhibition of Crown gall by Selected antibiotics. *Phytopath.* 45 : 618--625.
- Blanchard, Fred. 1951 : Aureomycin Chemotherapy of Crown gall in tomatoes. *Phytopath.* 41: 954--958.
- Braun, A.C. 1947 : Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in Crown gall. *Am. J. Botany* Vol. 34, No. 4.
- Brown, J.G. and Alice M. Boyle 1945 : Application of Penicillin to Crown gall. *Phytopath.* 35 : 521--524.

5. Hampton, J.E. 1948 : Cure of Crown gall with Antibiotics. *Phytopath.* 38 : 11.
6. Lipetz, J. 1965 : Crown gall Tumorigenesis: Effect of Temperature on Wound Healing and Conditioning. *Science* Vol. 149, No. 3686.
7. Rangaswami, G., Rae Rama Rao and Lakshanan, A.R. 1959 : Studies on the control of Citrus Canker with Streptomycin. *Phytopath.* Vol. 49, No. 4.
8. Johnson, Curl, Bond, Friburg. 1960 : Soil Microflora Plant Disease Relationships. Burges Publishing Co. p 71, p 104.