

유전자의 일시발현 분석용 숙주개발을 위한 카사블랑카백합 (*Lilium cv. Casablanca*) 화분립의 이용

박 희 성*

대구가톨릭대학교 식물유전공학과

(2004년 9월 20일 접수; 2004년 12월 3일 수리)

Key words: *Lilium cv. Casablanca*, pollen, *Agrobacterium*, transformation, GUS histochemistry

서 론

일시유전자발현기술은 특정 유전자의 기능을 분석하기 위한 간편하고 유용한 수단으로 이용되고 있다. 식물에서의 일시발현은 순수분리한 DNA를 사용하는 경우 particle bombardment에 의한 식물세포로의 도입과 electroporation에 의한 원형질체(protoplast)로의 도입방법이 있으며 *Agrobacterium* 진공침윤(Agroinfiltration)에 의하여 감염시키거나 바이러스 벡터를 식물체에 감염시켜 식물조직체로 유전자를 도입하는 방법이 있다.¹⁾ 일시발현분석을 수행하는 목적은 대규모의 형질전환식물체를 제조하기 전에 재조합된 대상 유전자의 산물이 식물체내에 성공적으로 수행되고 있음을 신속하고 용이하게 입증하기 위함이다. 형질전환식물체의 제조가 상당한 시간과 비용이 소요됨을 감안한다면 일시발현분석은 연구과정에 있어서 필수적이라고 볼 수 있다.

식물의 성숙한 속씨식물의 화분립(pollen grain)이 암술머리에 도착하면 발아를 시작하여 식물에 따라서 다양한 길이로 암술대를 따라 화분관이 신장하고(pollen tube elongation) 씨방의 밑씨에 도달하게 되면 화분관 내의 정핵세포가 방출되어 수정이 이루어진다.^{2,3)} 근래에는 식물체나 식물세포의 형질전환을 위한 전통적인 *Agrobacterium*이나 particle bombardment 방법이 화분에 적용되어, 화분을 살아있는 유전자운반체로 이용하여 형질전환식물체를 제조하기 위한 연구가 이루어져 왔는데 이는 유용유전자가 도입된 형질전환화분을 직접 암술에 수정시켜 형질전환 F1식물체를 신속하게 재조합으로써 상당한 시간이 소요되는 식물조직배양 및 재분화 과정을 생략할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 이러한 시도는 특히 형질전환체 제조에 상당한 시간이 소요되는 침엽수류를 대상으로 주로 이루어져왔다.^{4,5)} 그 외 밀,⁶⁾ 옥수수,⁷⁾ 페츄니아,⁸⁾ 백합,⁹⁾ *Arabidopsis*¹⁰⁾ 등의 화분을 이용한 관련된 연구가 또한 보고되어 있다. 화분은 sucrose, boric acid, calcium chloride 등을 주로 포함하는 단순 액체 또는 agar고체배지에서 가내배양이 가능하다.

백합은 대표적인 절화용 관상식물의 하나로서 Asiatic hybrid,

Oriental hybrid, Trumpet hybrid 계통 등의 품종이 잘 알려져 있는데, 계통에 따라 화색, 화형, 향기, 저항성 등에서 차이를 보이고 있다. 백합은 단자엽식물에 속하지만 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 식물체의 제조가 가능하며, 많은 양의 화분채취가 용이하여 화분과 관련된 기초연구의 재료로서도 애용되어 왔다. Oriental hybrid 계통의 품종인 카사블랑카백합(*Lilium cv. Casablanca*)은 구근의 크기에 따라 2-8개의 꽃을 피우며 하나의 식물체로부터 150 mg 정도의 화분립의 채취가 가능하다.

본 연구에서는 카사블랑카 화분에 대한 일시발현분석용 숙주로서의 개발가능성을 시험하였다. 즉 β -glucuronidase(GUS) marker 유전자를 지니는 *Agrobacterium*을 화분과 동시배양하여 형질전환을 유도하고, 배양에 의하여 신장된 카사블랑카화분에 대하여 histochemistry에 의한 GUS 유전자발현을 분석하여 그 결과를 제시하였다.

재료 및 방법

화분재료의 수집, 보관 및 배양. 경남지역의 백합농원으로부터 개화 직전의 카사블랑카백합을 절화상태로 다량 구매하여 실내의 수조에 배치시킨 후 27°C, 24 hr 일반 실내조명의 조건에서 개화를 유도하였다. 완전히 발달되어 꽃 수술의 표면에 노출된 화분은 수술에 붙어있는 상태로 함께 채취하여 -70°C에 보관하였다. 가내배양 시에는 이들은 조리용 스테인레스 체로 가볍게 쳐서 화분립 0.5-1.0 g을 155 mm petri plate에 채워 놓은 50 ml의 pollen germination medium(PGM: 1.6 mM H₃BO₃, 1.8 mM Ca(NO₃)₂, 10% sucrose, pH 5.7)에 골고루 뿌리고 27°C 암 상태에서 18-24 hr 발아시켰다.¹¹⁾

GUS유전자도입. Neomycin phosphotransferase II(NptII)와 cauliflower mosaic virus 35S(CaMV 35S) promoter: β -glucuronidase(GUS) 유전자(uidA)를 지니는 pBI121 plasmid 형질전환의 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 single colony를 streptomycin과 kanamycin이 각각 50 mg/L가 포함된 LB 배지에서 배양(18 hr, 28°C, 220 rpm)하여 원심분리 (13,000 rpm, 1 min)한 후, PGM으로 재현탁하여 OD₆₀₀=0.5로 조정하였다. 화분형질전환은 *Agrobacterium* 재현탁액 100 μ l을 PGM 50 ml에 혼합한 배지에 화분립을 첨가하여 27°C 암조건에서 18 hr 배양하였으며 이어서 cefotaxime(250 mg/L)을 투여한 후 6 hr

*연락처

Phone: 82-53-850-3245, Fax: 82-53-850-3459

E-mail: hspark@cu.ac.kr

배양을 지속하였다. 발아한 화분시료는 여과지를 이용하여 멸균수(0.2% Tween-20 포함)로 3회 충분히 세척하여 분석재료로 이용하였다.

Histochemistry. 멸균수로 세척한 배양화분은 50 mM NaPO₄(pH 7.0)용액으로 간단히 세척하고 이를 GUS발현검정에 이용하였다. X-Gluc(5 mg/100 μ l dimethylformamide)을 10 ml의 sodium phosphate용액(100 mM, pH 7.0)에 첨가하고 potassium ferricyanide와 potassium ferrocyanide 각각 최종 0.5 mM이 되도록 첨가하였으며 준비된 GUS substrate 용액에 배양화분을 넣어 27°C에서 발색반응을 시켰다.¹²⁾

Southern hybridization. 배양화분은 액체질소를 이용하여 갈아서 매우 고운 분말로 준비한 후 이를 CTAB용액과 chloroform : isoamylalcohol을 이용한 추출방법¹³⁾으로 genomic DNA를 분리하였다. 제한효소를 처리한 DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동시킨 후 alkaline용액(1 M NaCl, 400 mM NaOH)을 이용한 downward transfer에 의하여 nylon membrane에 부착시키고 UV-crosslinker(CL-1000, UVP Inc., USA)의 auto mode에 의하여 DNA를 고정시켰다. Hybridization [buffer(5X SSC, 0.1% SDS, 5% dextran sulfate), 50°C, 16 hr]을 위한 probe용 2.6 kb CaMV35S:GUS DNA의 labeling과 autoradiography에 의한 detection을 위하여 Bright Star Psoralen-Biotin nonisotopic labeling kit와 CDP-Star detection system(Ambion Inc. USA)을 각각 사용하였다.

결과 및 고찰

카시블랑카백합으로부터 채취, 수집 및 보관한 화분을 일시 발현시스템의 host로서 개발하기 위하여서 우선 기내에서의 적절한 화분배양조건의 확립이 필요하다. 따라서 위하여 -70°C에 보관한 화분의 발아 및 신장을 위하여 sucrose농도, pH, 배양 온도를 다르게 한 결과를 현미경으로 관찰하였다. 우선 화분배양에 가장 영향을 미치는 sucrose농도를 달리하여 PGM(pH 5.7)에서 화분배양(27°C, 18 hr, 암조건)을 수행하였다. Sucrose 농도를 7-15%로 조절하는 경우 이에 비해 상대적으로 낮거나 (0-5%) 높은(20%) 농도에서 보다 정상적인 화분신장이 이루어졌다. 한편, sucrose를 첨가하지 않는 경우에는 발아하지 않았다. PGM의 적정 sucrose농도는 10%로 결정하였다.

pH를 5.0-8.0으로 달리한 PGM(sucrose 10%)에서의 배양(18 hr, 27°C) 시, 상대적으로 높은 pH(8.0)에서는 화분발아 및 신장이 매우 저조하였으나 기타의 pH(7.5-5.0)에서는 정상적으로 나타났다. 초순수 멸균수로 준비하는 PGM의 pH는 보통 5.5-6.5로 측정되는데 이를 그대로 사용해도 화분생장에 영향을 미치는 경우는 거의 없었다.

한편, sucrose 10%, pH 5.7의 PGM에서의 화분생장은 그 배양온도(19-30°C)를 달리한 결과 상대적으로 높은 온도(30-25°C)에서 다른 낮은 온도(19-22°C)에서보다 보다 빠르게 신장하는 경향을 보였으나 낮은 온도에서도 배양시간을 24 hr동안 지속시켰을 경우 정상적으로 신장하였다(결과 미제시).

화분의 형질전환을 위한 bombardment 방법은 많이 이용되지만 이는 기술적으로 일부의 화분에 대한 형질전환이 가능할 뿐

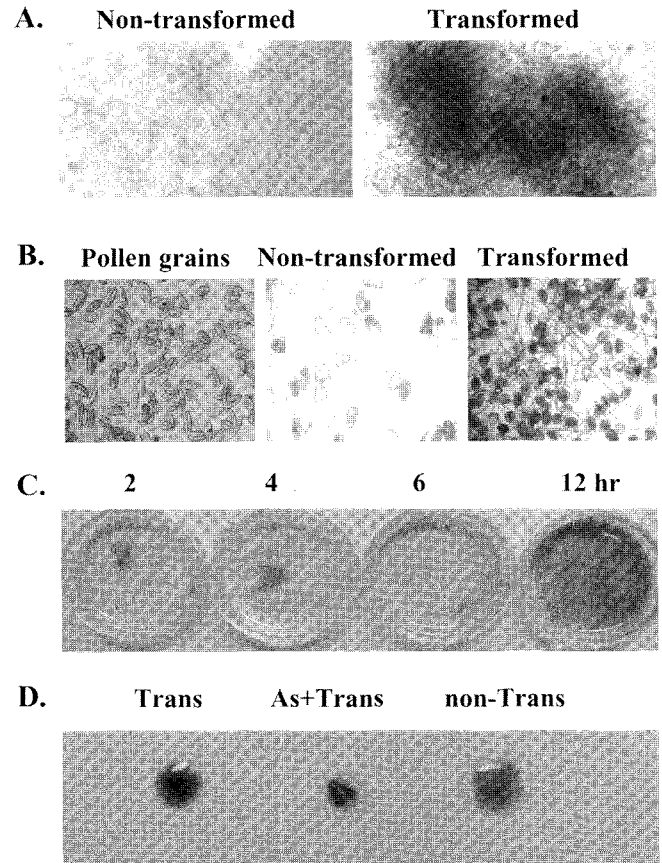


Fig. 1. Histochemical analysis of β -glucuronidase (GUS) enzyme activity from germinated *Lilium cv. Casablanca* pollen following co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 harboring pBI121 plasmid. A: Non-transformed and transformed represent pollen samples following transformation procedure using mocked *Agrobacterium* and pBI121-harbored recombinant *Agrobacterium*, respectively. B: Magnified pollen features of the non-transformed, transformed and native pollen grain. C: GUS expression of transgenic pollen during the time course from 2 to 12 hr following co-cultivation. D: GUS expression following *Agrobacterium*-mediated transformation with 200 μ M acetosyringone (Ac+Trans) or without (Trans) or mock transformation (non-trans).

이다. 따라서 본 연구에서는 화분전체를 일시발현 host로서의 개발을 목표로 *Agrobacterium*을 사용한 형질전환을 시도하였다. 백합화분은 발아 및 신장이 24 hr 이내에 종료됨으로써 형질전환체 선발을 위하여 사용되는 kanamycin(km) 사용(보통 50-100 mg/l)을 배제하였다. 백합식물체의 재배상태에 따른 화분상태에 따른 km 감수성 차이(25-100 mg/L) 또한 km 사용을 배제하도록 하였다.

한편, 형질전환과 발아신장 후(>18 hr)에는 cefotaxime(cf, 250 mg/L)을 6 hr를 처리하였는데 이는 배지에 여전히 존재하는 *Agrobacterium*을 제거하기 위한 것으로서 이러한 과정 후 신장 화분 및 배양액을 LB고체 배지에 도말하여 28°C에서 배양시킬 경우 colony형성은 관찰되지 않았다(결과 미제시).

A. tumefaciens LBA4404 : pBI121 배양현탁액을 화분립과 18 hr 동시배양 후 cf를 6 hr 처리한 다음 멸균수로 세척한 화분에 대하여 GUS histochemistry 분석을 수행하였으며 그 결과는 Fig. 1에 나타나고 있다. Fig. 1A는 비형질전환(Non-transformed)

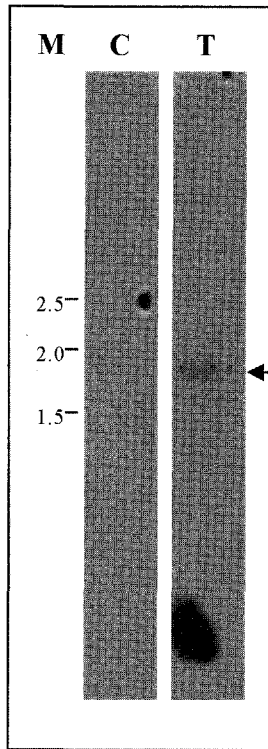


Fig. 2. Southern blot analysis of β -glucuronidase (GUS) DNA from transgenic *Lilium cv. Casablanca* pollen following *Agrobacterium*-mediated transformation. 10 μ g of pollen genomic DNA digested with *Bam*HI and *Sac*I was electrophoresed on 0.8% agarose and transferred to nylon membrane for Southern blot hybridization. M, DNA size marker in kb; C, non-transformed pollen; T, transformed pollen.

과 형질전환(Transfomed)시킨 화분의 GUS발현을 나타내는 것인데 신장화분은 영킨 덩어리 상태로 수확된다. 따라서 그림에 나타나는 모습은 영켜있는 화분모습으로서 형질전환화분의 경우 매우 진한 푸른색을 나타내고 있으며 이는 GUS 효소의 정상적 발현에 의한 결과인 것을 강하게 입증하고 있다. 비형질전환 화분의 경우에는 연한 녹색이 나타나고 있다.

Fig. 1B는 확대한 모습(100x)으로서 화분립 상태(Pollen grain), 비형질전환 배양화분(Non-transformed), 형질전환 배양화분(Transfomed)을 나타내고 있다. 한편, *Agrobacterium*과의 동시배양에 의한 화분의 reporter gene인 GUS의 발현시기에 대한 관찰을 시도하였다. 활발하게 신장하는 화분은 3-4 hr 경과에도 30-70배 길이로 완전히 자랄 수 있으며 따라서 신장과 발현시기의 상관성을 분석하기 위함이었다.

그러나 Fig. 1C에서 보이는 것과 같이 2-4 hr 경과 시에는 극히 일부에서만 발현되는 양상을 보였으며 12 hr 경과 후에야 강하게 발현되는 결과를 얻었다. 그러므로 일시발현분석을 위한 화분의 수확은 12 hr 이상의 배양이 적절한 것으로 판단하였다.

물리적 상처를 입은 식물체로부터 분비되는 phenolic compound인 acetosyringone은 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환의 효율성을 높이기 위하여 종종 사용되는 물질로서 이를 화분에 대하여 시험하였다. Acetosyringone 200 M^{10} 을 첨가한 PGM에서 화분 및 *Agrobacterium*을 동시배양 후 GUS 발현을

비교하였으며 그 결과는 Fig. 1D에 제시하였다. 발색정도에 의한 비교 시 별 차이를 나타내지 않고 있으며 화분에 대한 형질전환에서는 그 효과가 크게 나타나지 않고 있음을 시사하고 있다.

Fig. 2는 GUS 유전자 도입을 확인하기 위한 Southern hybridization의 결과이다. CaMV35S promoter(0.8 kb)와 GUS 유전자(1.8 kb)가 포함된 2.6 kb의 probe DNA를 *Bam*HI과 *Sac*I으로 처리한 화분 genomic DNA와 hybridization시켰을 때 형질전환화분(lane T)에서 1.8 kb DNA가 관찰되고 있으며 비형질전환(lane C)화분에서는 나타나지 않았다. 언급한 바와 같이 이 실험에서는 *Agrobacterium*으로부터의 DNA오염을 없애기 위하여 cf를 처리하고(6 hr) 충분한 세척 후 bacteria colony형성이 없는 화분시료로부터 얻은 genomic DNA를 사용하였다. 그러므로 이 결과는 형질전환에 의한 화분 내 GUS유전자(1.8 kb)가 성공적으로 도입되었음을 강하게 증명하고 있다.

백합은 계절에 관계없이 국내에서 쉽게 다량으로 입수할 수 있으며 이로부터의 살아있는 화분은 냉동상태로 장기보관이 가능하다. 그리고 화분의 기내배양은 매우 단순하며 그 배양시간도 24 hr내에 종료시킬 수 있다. 다만 재배환경에 따른 화분의 상태 또는 장기 냉동보관에 따른 화분발아가 달라질 수 있다. 그러나 고체 도는 액체배지에서 간단한 예비 발아 실험으로 그 상태를 점검함으로써 충분한 활성을 지닌 batch를 선택하여 이용한다면 이러한 문제점은 용이하게 해결할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구를 통하여 입증한 바와 같이, *Agrobacterium*을 이용한 GUS 유전자발현에 근거하여 특히 진핵세포에서의 일시유전자발현 및 분석이나 protein modification에 의한 발현 단백질의 분석이 필요 시 카사블랑카 백합화분을 일회성 host로 손쉽게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Fisher, R., Vaquero-Martin, C., Sack, M., Drossard, J., Emans, N. and Commandeur U. (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 113-116.
2. McCormick, S. (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell* **5**, 1265-1273.
3. Taylor, L. P. and Helper, P. K. (1997) Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 461-491.
4. Aronen, T. S., Nikkanen, T. O. and Haggman, H. M. (1998) Compatability of different pollination techniques with microprojectile bombardment of Norway spruce and Scots pine pollen. *Can. J. For. Res.* **28**, 79-86.
5. Fernando, D. D., Owens, J. N. and Misra, S. (2000) Transient gene expression in pine pollen tubes following particle bombardment. *Plant Cell Rep.* **19**, 224-228.
6. Hess, D., Dressler, K. and Nimmrichter, R. (1990) Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelete of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* **72**, 233-244.
7. Tjokrokusumo, D., Heinrich, T., Wylie, S. Potter, R. and McComb, J. (2000) Vacuum infiltration of *Petunia hybrida*

- with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. *Plant Cell Rep.* **19**, 792-797.
8. Luo, Z. X. and Wu, R. (1989) A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol. Biol. Rep.* **7**, 69-77.
9. van der Leede-Plegt, L. M., Ven, B. C. E. K., Franken, J., van Tuyl, J. M., van Tunen, A. J. and Dons, H. J. M. (1997) Transgenic lilies via pollen-mediated transformation. *Acta Hort. (ISHS)* **430**, 529-530.
10. Bethold, N., Ellis, J. and Pelletier, G (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants, *CR. Acad. Sci. Paris Life Sci.* **316**, 1194-1199.
11. Park, H. S. and Park, I. H. (2002). Analysis of UreB protein synthesis from transgenic lily pollen. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 577-581.
12. Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.
13. Glick, B. R. andompson, J. E. (1993) In *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 38-40.
14. Lohrke, S. M., Yang, H. and Jin, S. (2001) Reconstitution of acetosyringone-mediated *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene expression in the heterologous host *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 3704-3771.

Utilization of Pollen Grain from *Lilium cv. Casablanca* as a Transient Gene Expression Host

Hee Sung Park (Department of Plant Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Korea)

Abstract: *Lilium cv. Casablanca* pollen grains stored at -70°C were grown in pollen germination medium with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 cells harboring pBI121 for 18 hr at 27°C . Following this, cefotaxime (250 mg/L) was treated for 6 hr to eradicate the bacterial cells. Histochemical GUS analysis revealed that the transgenic pollen displayed deep blue color mostly from 12 hr after the co-cultivation. Presence of 200 μM acetosyringone was determined not to be more effective for GUS transformation than its absence. GUS DNA integration in the transgenic pollen genomic DNA was clearly demonstrated by Southern blot analysis.

Key words: *Lilium cv. Casablanca*, pollen, *Agrobacterium*, transformation, GUS histochemistry