

## 물리적, 화학적, 생물적 요인에 의한 백합 (*Lilium longiflorum* cv. Georgia) 화분의 생장 및 *Agro*-Infiltration을 이용한 GUS 발현

박희성\*

대구가톨릭대학교 식물유전공학과

### Impact of Physical, Chemical and Biological Factors on Lily (*Lilium longiflorum* cv. Georgia) Pollen Growth and GUS Expression via *Agro*-infiltration

Hee Sung Park\*

Department of Plant Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea

**ABSTRACT** To lily (*Lilium longiflorum* cv. Georgia) pollen, impacts by some physical, chemical and biological factors were examined in respects of its growth and transient gene expression via *agro*-infiltration. Rolling movement in liquid medium or vacuum pressure during *Agro*-infiltration was regarded as a impact that should be minimized for normal pollen growth. Pollen growth was maintained well in relatively broad range of temperature (19 to 27°C) or pH (5.0 to 8.0). Chemical factors such as cefotaxime (up to 300 mg/L), acetosyringone (up to 800 µM) and syringealdehyde (up to 800 µM) did not show any harmful effects but kanamycin severely did even at concentration as low as 25 mg/L in some cases. For GUS gene expression, acetosyringone at 200 to 400 µM slightly improved the efficiency while syringealdehyde did not. Brief *agro*-infiltration followed by 18 hr of co-incubation of pollen along with *Agrobacterium* was suggested as a condition basically required for the transient expression system using lily pollen regardless of the presence of acetosyringone.

**Key words:** Acetosyringone, *agro*-infiltration, lily pollen, transformation, transient expression

#### 서 론

Transient expression (일시발현)기술은 특정 유전자의 기능을 분석하기 위한 간편하고 유용한 수단으로서 식물에서는 순수 분리한 DNA를 사용하는 particle bombardment에 의한 식물세포 또는 조직체로의 도입과 electroporation에 의한 protoplast로의 도입, *Agrobacterium* 재조합체를 이용하는 *agro*-infiltration에 의한 식물조직이나 식물체로의 도입, 또한 재조합 바이러스 벡터를 식물체에 감염시키는 방법 등에 의존하고 있다 (Fisher et al. 1999). 일시발현의

목적은 재조합 유전자의 식물체내 발현을 신속하고 용이하게 분석함으로써 상당한 시간과 비용이 소요되는 대규모의 형질전환식물체의 제조를 보다 효율적으로 수행하기 위한 예비 분석 작업으로서 한편 이는 재조합의약단백질의 간편한 생산을 위한 수단으로서도 많이 시도되고 있다 (Doran 2000; Giddings 2001). 성숙한 화분은 암술에 도달하여 발아를 개시하며 그 신장을 통하여 결국 밑씨에 도달하고 정핵세포를 방출함으로써 수정을 이루도록 하는데 (McCormick 1993) 근래에는 *Agrobacterium*이나 particle bombardment 방법에 의하여 화분의 형질전환을 수행함으로써 신속한 형질전환식물체의 제조를 위한 유전자운반체로 이용되기도 한다. 이러한 시도는 특히 형질전환식물체의 제조에 상당한 시간을 요하는 침엽수를 대상으로 이루어져왔는데

\*Corresponding author Tel 053-850-3245 Fax 053-850-3459

E-mail hspark@cu.ac.kr

(Aronrn et al. 1998; Fernando et al. 2000), 벼 (Luo and Wu 1989), 밀 (Hess et al. 1990), 옥수수 (Schreiber and Dresselhaus 2003), 페추니아 (Tjokrokusumo et al. 2000) 등에서도 보고되고 있다. 백합 (*Lilium* spp.)은 monocot임에도 불구하고 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 식물체의 제조가 가능한 것으로 잘 알려져 있으며 (Watad et al. 1998; Nishihara et al. 1993; Hoshi et al. 2004) 본 연구에서는 생산량이 많은 백합의 화분을 이용한 형질전환 및 일시발현을 수행하였는데 *Lilium longiflorum* cv. Georgia로부터의 화분을 수집 및 보관하면서 일시발현을 위한 소모성 숙주로서의 개발가능성을 시험하였다. 이를 위하여 물리적 (vacuum, rotating suspension, 온도), 화학적 (pH, kanamycin, cefotaxime, virulence inducer인 acetosyringone 및 syringealdehyde), 생물적 (*Agrobacterium* cells) 요인들의 화분의 기내배양과 GUS 형질전환에 대한 영향을 신장 화분의 생체중량과 histochemistry를 이용한 유전자발현의 변화로써 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

제주지역의 농원으로부터 2004년 8월 경 개화 직전의 백합 (*Lilium longiflorum* cv. Georgia)을 절화상태로 대량 구매하여 실내의 수조에 배치시킨 후 27°C, 24 hr 일반 실내조명의 조건에서 개화를 유도하였다. 개화된 꽃으로부터의 완전히 발달한 수술 (조직 표면에 화분이 노출되어 부착되어 있는 상태)을 그대로 채취하여 petri dish에 넣고 밀봉한 후 냉동고 (-70°C)에 보관하였으며 필요 시 마다 꺼내어 사용하였다. 기내배양을 위하여 이들을 스테인레스 체 (>40 sieve)에 얹혀 가볍게 쳐서 화분립을 수집하고 이들 0.5-1.0 g의 화분을 155 mm petri plate에 채워 놓은 50 mL의 pollen germination medium (PGM: 1.6 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.8 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 10% sucrose, pH 5.7)에 골고루 뿌려 27°C 암 상태에서 18-24시간 발아시켰다 (Park and Park 2002). 발아 및 신장한 화분의 중량측정은 화분배양액을 60 mesh에 통과시켜 남아있는 시료를 수집한 후 이를 filter paper에 얹혀 지나친 물기를 제거한 다음 그 생체중량 (fresh weight)을 측정하였다.

### *Agrobacterium*과 화분의 동시배양

백합화분에서의 일시발현을 위한 vector는 neomycin phosphotransferase II (NptII)와 Cauliflower mosaic virus 35S (CaMV 35S) promoter:β-glucuronidase (GUS) 유전자 (*uidA*)를 지니는 pBI121을 이용하였다. pBI121 형질전환된 재조

합 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 single colony를 streptomycin (50 mg/L)과 kanamycin (50 mg/L)가 포함된 LB 배지에서 배양 (18 hr, 28°C, 220 rpm)하고 원심분리 (13,000 rpm, 1 min)에 의하여 *Agrobacterium* cell을 얻은 후 이는 PGM으로 재현탁하여 OD<sub>600</sub> = 0.5로 조절하였다. 화분형질전환을 위하여 박테리아 현탁액 100 μL을 PGM 50 mL에 섞고 이에 화분립 0.5-1.0 g을 배지 위에 골고루 얹은 후 vacuum-infiltration (1 min)을 시행하였다. 이 때 acetosyringone 또는 syringealdehyde등을 포함시키기도 하였다. 이들은 22°C 암 조건에서 18 hr 정치시킨 후 cefotaxime (250 mg/L)을 투여하고 27°C 조건으로 옮겨 6 hr의 정치를 지속하였다.

## GUS Histochemistry

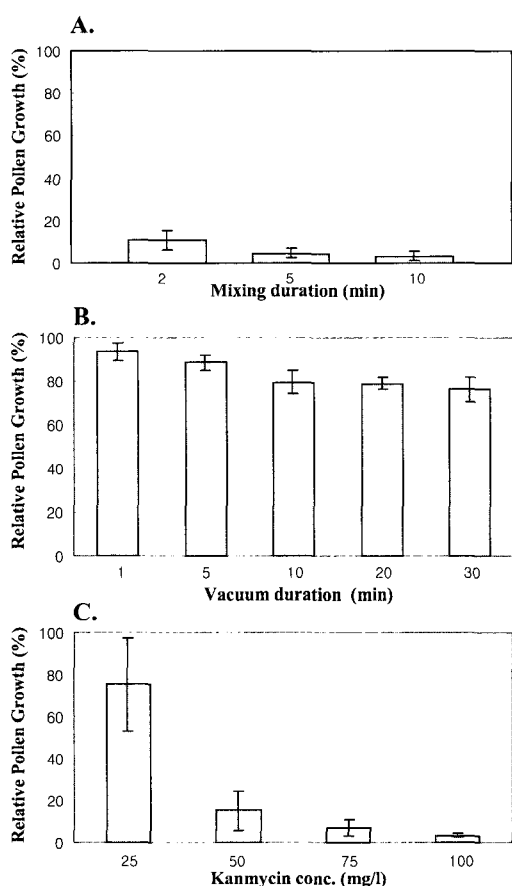
화분시료는 여과지를 이용하여 0.2% Tween-20이 포함된 멸균수로 3회 충분히 세척하고 다시 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.0 용액으로 세척하고 이를 GUS발현검정에 이용하였다. X-GlcA (5 mg/100 μL dimethylformamide)을 10 ml의 sodium phosphate용액 (100 mM, pH 7.0)에 첨가하고 potassium ferricyanide와 potassium ferrocyanide 각각 최종 0.5 mM이 되도록 첨가하였으며 준비된 GUS substrate 용액에 세척한 화분을 넣어 27°C에서 발색반응을 시켰다 (Jefferson 1987).

## 결과 및 고찰

### 화분발아 및 신장에 미치는 물리적 화학적 요인의 영향 규명

배합화분은 물리 화학적 자극에 매우 민감하게 반응하며 특히 액체배양 시에는 경우에 따라 발아를 전혀 못하는 경우가 있으며 따라서 화분의 정상적인 발아에 영향을 미칠 수 있는 요인들의 다각적 분석이 필요하다. 가령, PGM은 기본적으로 sucrose, calcium, boric acid 등이 포함되어 있는데 sucrose의 경우 7-10%가 적정한 것으로 나타나고 있으며 15% 이상의 경우 발아에 나쁜 영향을 미치게 된다 (Park and Park 2002). 본 연구에서는 화분의 기내배양을 실시하면서 물리적 요인인 충격, vacuum, 배양온도를 그리고 화학적 요인으로서 배지성분인 sucrose, calcium, boric acid 이외의 acetosyringone (As), syringealdehyde (Sa), kanamycin (Km), cefotaxime (Cf)에 대하여 조사하였다. 충격은 화분을 배지에 투여한 후 골고루 섞어주기 위한 교반작업을 의미하며 vertical rotator에 0.5 g의 화분과 50 ml PGM을 채워 놓은 50 mL tube를 설치하고 30 rpm의 속도로 2, 5, 10 min 동안 회전시켰다. 이들은 각기 18 hr 배양 후 화분을 직접배지에 투여한 후 배양시킨 것과 비교하였

으며 60 mesh stainless sieve에 걸려있는 신장된 화분의 생체중량을 측정된 결과 회전교반으로 처리된 화분의 생장배양액은 sieve를 거의 통과함으로써 충분히 신장한 화분이 거의 남지 않았다 (Figure 1A). 이는 약한 물리적 충격에도 화분이 매우 민감하게 반응하는 것을 나타내고 있으며 따라서 sieve를 이용하여 화분립을 모은 후 액체배지에 투여 및 교반하는 대신 sieve를 배지 위에 설치하여 이를 통과하는 화분이 배지 표면에 직접 골고루 투하되도록 하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. Vacuum은 agro-infiltration의 수행을 위한 작업으로서 본 조사에서는 *Agrobacterium*이 없는 화분배양액을 시간 (1, 5, 10, 20, 30 min) 별로 달리 한 vacuum 처리 후에 화분의 발아신장을 측정하였다. 그 결과 1-5 min 처리에서는 별 차이는 없었으나 10, 20, 30 min의 처리의 경우 70-80% 정도로 나타났고 (Figure 1B) 현미경 관찰 시 화분의 정상적 신장이 저해되어 화분신장이 짧은 경우가 많이 나타났다. 또 다른 물리적 요인으로서

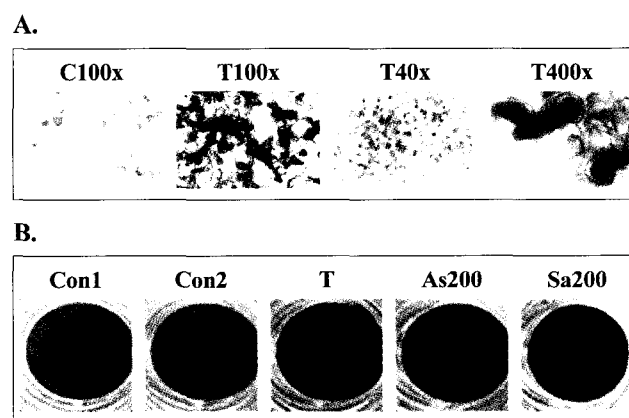


**Figure 1.** Influence of physical and chemical factors on lily pollen growth *in vitro*. Experiment of certain period time of pollen mixing in liquid medium (A) or vacuum infiltration using aspirator (Iwaki, AP-13) (B) or addition of varying concentration of kanamycin (C) to pollen in PGM was analyzed after pollen incubation for 18 hr at 27°C by weighing the elongated fresh pollen tubes retained on 60 stainless mesh. Mean values of 4 replicates is represented as relative % value in comparison to the untreated control pollen culture.

의 온도를 달리하여 (19, 21, 23, 25, 27, 30°C) 화분을 배양하고 신장된 화분의 중량을 비교하였다. 27°C를 100%로 하였을 때 30°C는 60% 정도 그리고 낮은 온도인 19, 21, 23°C에서는 80-90%로 측정되었으며 25°C의 경우 거의 100%에 도달하였다. 그러나 낮은 온도군의 화분은 24 hr 이상 배양 시 27°C 18 hr 배양과 같은 수준에 거의 도달하였으며 높은 온도의 경우에는 변함이 없었다. 화학적 요인으로서 우선 As, Sa의 농도 별 투여에 의한 화분발아 및 신장을 비교하였다. 이들 virulence inducer (Lohrke et al. 2001)들은 각기 0, 100, 200, 400, 800 µM을 투여한 화분 배양액을 27°C에서 18 hr 배양하였는데 화분관의 중량 면에서 처리 농도 별 차이가 없었으며 현미경 관찰에서도 마찬가지였다. 다음으로 형질전환 후 선발에 이용되는 Km과 *Agrobacterium* 제거를 위한 Cf가 미치는 영향을 조사하였다. Km의 경우 0, 25, 50, 75, 100, 125 mg/L를 Cf의 경우 0, 100, 150, 200, 250, 300 mg/L의 처리를 비교하였는데 Km의 경우 50 mg/l에서 급격히 그 신장화분의 중량이 감소하였으나 (Figure 1C) Cf의 농도별 처리에서는 무처리 군과 거의 차이가 없었다. Km의 경우 25-50 mg이 형질전환화분체 선발을 위한 농도로서 제시되었으나 현미경 관찰 시 25 mg/L의 처리 군에서 충분히 신장하지 못한 화분이 자주 나타남으로써 Km에 대한 민감도가 매우 높은 것으로 판단되었다.

#### As, Sa를 이용한 agro-infiltration 및 화분의 형질전환

*Agrobacterium*에 의한 화분의 형질전환 결과는 Figure 2에 나타나고 있으며 형질전환과 비형질전환의 배양화분에 대한 GUS histochemistry의 결과를 현미경배율에 따라 관찰한 것이 Figure 2A에 보이고 있다. 형질전환을 위한 기본



**Figure 2.** Histochemistry of pollen tube. A: C, untransformed pollen; T, pBI121-transformed. Number attached represents microscopic magnification. B: con1, untransformed; con2, *A. tumefaciens* LBA4404 mock-transformed; T, pBI121-transformed; As200 and Sa200, pBI121-transformed in the presence of acetosyringone (200 µM) or syringaldehyde (200 µM), respectively.

적인 수행방법은 상기에서의 물리적, 화학적 요인에 의한 결과에 따라 다음과 같이 정하였다. 즉, vacuum infiltration을 5 min 처리한 화분과 *Agrobacterium*의 PGM에서의 동시 배양체를 22°C에서 18 hr 정치배양하고 이어서 Cf (250 mg/L)를 처리한 후 27°C에서 6 hr 배양을 지속하였으며 그로부터의 신장한 화분에 대하여 histochemistry를 실시하였다. PGM으로 재현탁시킨 *Agrobacterium* 10, 50, 100 µL를 0.5-1.0 g의 화분이 들어있는 배양액에 섞어 투여하는 경우 투여하지 않은 화분배양액에 비하여 80-90% 정도의 신장 화분의 생체량이 감소하는 결과를 보였으며 이는 약간의 생물적 요인에 의한 화분생장의 저해현상으로 판단된다. 한편, *Agrobacterium* cell population을 위에서와 같이하여 달리한 후 이에 의한 형질전환 시 화분의 GUS발현에 의한 발색 spot을 비교 시 별 차이를 나타내지 않았다. 형질전환을 위한 배양 온도에서도 22°C에서 27°C로 전환하는 경우와 27°C 단일온도로 수행하는 경우 온도전환의 경우가 약간의 형질전환율이 증가하는 경향을 보였다 (이상 결과 제시하지 않음). 온도전환방법으로 본 연구를 주로 수행한 이유는 *Agrobacterium*의 형질전환이 낮은 온도 (19-22°C)에서 더 효율이 높다고 알려져 있으며 (Salas et al. 2001), 이러한 온도에서는 화분의 발아 및 신장이 크게 영향을 받지 않는 상황에서도 세균의 증식을 지연시킨다는 점, 그리고 전환된 27°C의 화분신장 및 세균증식의 적정온도에서 Cf의 항생제 작용을 증대시켜 *Agrobacterium*의 효과적인 제거를 유도한다는 점 등에 의하였다. As와 Sa 투여 시 agro-infiltration에 의한 화분형질전환의 결과를 비교하였다 (Figure 2B). As와 Sa는 이미 언급한 바와 같이 화분신장에 대한 화학적 요인으로서의 억제효과는 보이지 않았는데 이들에 대한 농도 (0, 100, 200, 400, 800 µM) 별 처리에 의한 GUS유전자 발현을 화분에서의 그 발색 spot으로 양적 비교를 수행하였다. 배양이 끝난 후 멸균수와 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 세척한 발아하지 않았거나 발아 및 신장한 모든 화

분을 측정하였다. Sa는 이를 처리하지 않은 대조군과 비교 시 거의 차이를 나타내지 않았으며 오히려 약간의 형질전환이 저하하는 현상도 조사되었다. As의 경우 Figure 3에서와 같이 200, 400 µM의 10-15% 정도의 형질전환 화분수의 증가를 나타냈으나 기타 농도에서는 처리하지 않은 GUS발현의 것과 차이가 나타나지 않았다.

백합화분의 기내배양은 물리적 충격에는 매우 취약하였으나 비교적 넓은 범위의 온도 및 pH에서 용이하게 이루어질 수 있었음이 나타났다. 한편, 형질전환을 위하여 필요한 agro-infiltration 과정에서는 vacuum 상태가 길게 지속되는 경우 이 또한 물리적 스트레스로 작용하였으며 *Agrobacterium*은 생물적 스트레스로 작용하기도 하였다. 화학적 요인으로서 Km의 경우 이에 대하여 화분이 매우 민감한 반응을 보였으며 Km 농도에 따라 화분의 감수성이 동일하지 않았는데 따라서 Km을 이용한 형질전환체의 선발과정을 생략하였으며 transient expression의 목적에서는 불필요한 과정으로 판단되었다. 다른 화학적 요인으로서의 As와 Sa는 비교적 고농도에서도 화분신장에 대한 억제작용을 보이지는 않았으나 화분의 형질전환을 위한 본 연구에서의 수행 조건 하에서는 Sa는 영향을 미치지 못하였으며 As의 경우에서도 형질전환 효율을 크게 증가시키지는 못하였다. 이상의 결과에 따르면 백합화분은 생명력을 그대로 지닌 상태에서 장기보관이 가능함으로 물리적 스트레스가 적은 조건에서의 용이한 기내배양과 *Agrobacterium* 동시배양에 의한 대량 화분의 형질전환이 비교적 수월하게 이루어질 수 있음으로써 쉽게 준비될 수 있는 transient expression host로서의 가능성이 충분할 것으로 예상된다.

## 적 요

백합 (*Lilium longiflorum* cv. Georgia) 화분의 성장과 agro-infiltration에 의한 일시발현에 대한 물리적, 화학적, 생물적 요인의 영향을 분석하였다. 화분을 배지에 섞기 위한 물리적 과정이나 agro-infiltration을 위한 진공작업과정은 정상적 화분생장을 위하여 최소화되는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 비교적 넓은 범위에서의 온도 (19 to 27°C)나 pH (5.0 to 8.0)에서 화분의 생장이 유사하게 진행되었으며 화학적 요인으로서의 cefotaxime (300 mg/L), acetosyringone (800 µM), syringaldehyde (800 µM) 등의 처리는 화분의 성장에 영향을 나타내지 않았다. 그러나 kanamycin의 경우 매우 심한 성장저해현상을 보였는데 25 mg/L의 농도에서도 저해현상을 보이는 경우도 있었다. GUS유전자의 화분발현 시 acetosyringone (200-400 µM)의 처리에 의하여 그 효율이 약간 향상되는 것으로 나타났으나 syringaldehyde의 경우에는 효과가 없었다. 짧은 시간 내의 agro-infiltration과정과 이어서 18 hr의 화분 및 박테리아의 동시배양으로서도

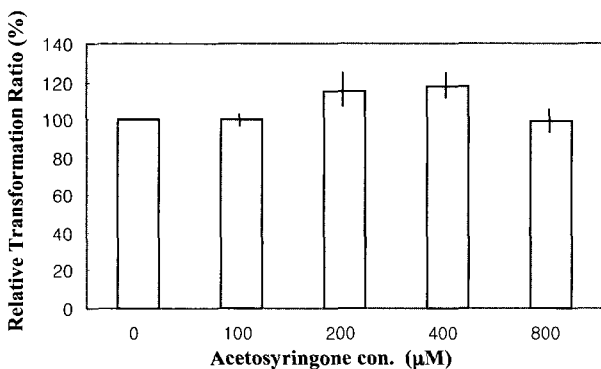


Figure 3. Effect of acetosyringone (As) on pollen transformation via agro-infiltration. Average number of GUS-expressing blue spots or tubes counted from 4 replicates was converted to relative % value in comparison to the As-untreated pBI121-transformed pollen sample.

acetosyringone의 첨가에 상관없이 화분에서의 GUS 일시 발현결과를 얻을 수 있었다.

## 인용문헌

- Aronen TS, Nikkanen TO, Haggman HM (1998) Compatibility of different pollination techniques with microprojectile bombardment of Norway spruce and Scots pine pollen. *Can J For Res* 28: 79-86
- Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotech* 11: 199-204
- Fernando DD, Owens JN, Misra S (2000) Transient gene expression in pine pollen tubes following particle bombardment. *Plant Cell Rep* 19: 224-228
- Fisher R, Vaquero-Martin C, Sack M, Drossard J, Emans N, Commandeur U (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol Appl Biochem* 30: 113-116
- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. *Curr Opin Biotech* 12: 450-454
- Hess D, Dressler K, Nimmrichter R (1990) Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelet of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci* 72: 233-244.
- Hoshi Y, Kondo M, Mori S, Adachi Y, Nakano M, Kobayashi H (2004) Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 22: 359-364
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405
- Lohrke SM, Yang H, Jin S (2001) Reconstitution of acetosyringone-mediated *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene expression in the heterologous host *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 3704-3771
- Luo ZX, Wu R (1989) A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol Biol Rep* 7: 69-77
- McCormick S (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1273
- Nishihara M, Ito M, Tanaka I, Kyo M, Ono K, Irifune K, Morikawa M (1993) Expression of  $\beta$ -glucuronidase gene in pollen of lily (*Lilium longiflorum*) tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana rustica*, and peony (*Paeonia lactiflora*) by particle bombardment. *Plant Physiol* 102: 357-361
- Park IH, Park HS (2002) Lily pollen growth in vitro and *Agrobacterium*-mediated GUS gene transformation via vacuum-infiltration. *J Plant Biotechnol* 4: 151-154
- Salas MG, Park SH, Srivatanakul M, Smith RH (2001) Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Rep* 20: 701-705
- Schreiber DN, Dresselhaus T (2003) In vitro pollen germination and transient transformation of *Zea mays* and other plant species. *Plant Mol Biol Rep* 21: 31-41
- Tjokrokusumo D, Heinrich T, Wylie S, Potter R, McComb J (2000) Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. *Plant Cell Rep* 19: 792-797
- Watad AA, Yun DJ, Matsumoto T, Niu X, Wu Y, Konomowicz AK, Bressan RA, Hasegawa PM (1998) Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Rep* 17: 262-267

(접수일자 2004년 10월 27일, 수리일자 2004년 12월 7일)