

Agrobacterium 공동배양을 이용한 고추 소포자 유래 초기 배의 GFP 발현

정 민, 인동수, 김봉규, 장인창, 박은준¹, 김문자¹, 한지학*
(주)농우바이오 생명공학연구소, ¹목원대학교 생명과학과

GFP expression in the microspore-derived early embryo through co-culturing with *Agrobacterium*

Min Jung, Dong Su In, Bong Kyu Kim, In Chang Jang, Eun Joon Park¹, Moon Za Kim¹, and Chee Hark Harn*

Biotechnology Institute, Nongwoo Bio Co, Yeosu, Gyeonggi, Korea

¹Department of Life Sciences, Mokwan University, Seo-gu, Taejeon, Korea

ABSTRACT The aim of this research is to establish the conditions for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using microspore. The embryo induction from the microspore was examined under several Kanamycin concentration in media, and the induction rate decreased about 4, 8, 10 times when the Kanamycin concentration increased 10, 50, 100 mg/L, respectively. This indicates that the transformation rate would be much lower if the Kanamycin was used for selection marker. In order to apply the *GFP* gene as a reporter gene for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, GFP expression from the microspore-mediated embryos was observed using GFP filter under microscope. The GFP expression occurred when the microspore cultured toward the embryo development for 12, 24 and 48 days. The microspore formed a cluster by microspore division from 12 days culture and continuously became a bigger mass. We obtained a total of 8 GFP-expressing embryos suggesting that the transformation of microspore occurred. However, those young embryos were not fully developed. Further study pertinent to culture conditions is required to fulfill the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using microspore

서 론

고추는 형질전환이 어려운 작물이어서 생명공학을 이용하여 새로운 신품종 개발을 하는 과정 자체가 거의 불가능하였다. 그러나 최근에 *Agrobacterium* 공동배양을 이용하여 고추를 형질전환 방법이 개발되어 (Lee et al. 2004) 원하는 target 유전자를 삽입할 수 있는 전기가 마련되었다. 그러나 아직 그 방법은 성공한 실험실에서만 국한됨으로서 보편화

된 방법은 아니다. 그리고 일반적으로 캘러스를 통한 재분화시 오랜 기관발생을 유도함으로써 5~10%의 somaclonal variation을 동반하는 단점이 있다 (Soniya et al. 2001). 따라서 좀 더 편리하고 쉽게 접근할 수 있는 고추 형질전환 방법을 개발하는 것이 중요한 과제이다.

종자회사에서는 육종프로그램중의 하나로 약 배양, 소포자 배양, 배 배양 등을 수행하여 반수체를 인위적으로 생산하는데 이 반수체를 콜히친 처리하여 배가반수체를 만들어 식물육종에 용이하게 사용하고 있다. 일반적으로 반수체 생산에 약 배양을 사용하는 경우가 많은데 약 배양인 경우는 약벽 조직의 체세포 분열이 2가 식물체를 만들 가능성이 높

*Corresponding author Tel 031-883-7055 Fax 031-884-7065

E-mail: chharn@nongwoobio.co.kr

아서 반수체를 개발하는데 약 속의 소포자만 이용하는 소포자 배양이 보다 더 효율적이다. 특히 고추인 경우 나출 소포자로부터 배를 유기하는 조건들이 밝혀지고 다수의 배와 유식물체를 확보하는 시스템이 구축되었다 (Park et al. 2005; Lee et al. 2007; Kim et al. 2007a).

식물 형질전환을 수행 시 자엽이나 배축을 이용하지 않고 이런 소포자 또는 소포자유래 배 조직에서 형질전환을 하는 방법이 제시되었다. 보리 소포자에 유전자총을 이용한 형질전환을 수행하여 R0 개체를 확보하였으며 (Jähne et al. 1994) 담배의 embryogenic pollen에 유전자총을 이용하여 형질전환을 한 후 T₁ 세대까지 확보하였다 (Stöger et al. 1995). 가장 최근에 시도된 연구는 밀 소포자 유래의 배와 배발생 캘러스를 목적조직으로 여러 가지 *GUS* 유전자를 유전자총으로 삽입하여 효과적인 promoter의 activity를 보기위해서 transient expression을 조사하였다 (Kim et al. 2007). 이런 소포자 이용 형질전환 방법의 장점은 많은 양의 소포자를 형질전환에 이용할 수 있어서 재료확보에 제한이 없다는 것이다. 또한 성공한다면 petri-dish에서 somaclonal variation이 적은 배를 대량 얻을 수 있는 장점이 있다.

지금까지의 연구는 극소수의 경우들이지만 전부 유전자총을 이용 하였으며 *Agrobacterium*을 이용한 경우는 없었다. 본 연구는 고추의 소포자 유래 배 발생의 고효율 조건 확립과 대량 유식물체 확보할 수 있는 기초 연구 (Park et al. 2005; Lee et al. 2007; Kim et al. 2007a)에 부응하여 고추 소포자의 *Agrobacterium* 공동배양을 시도하기 위한 조건을 구축하고자 하였다. 현재 *Agrobacterium* 공동배양를 통하여 소포자 다형체 또는 소포자 유래 초기 배에서 GFP 발현을 확인하였으며 이 방법을 통한 대량의 배 발생, 유식물체가 확보되면 고추 대량 형질전환의 새로운 기술로 자리매김할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

식물재료

소포자 확보를 위한 고추 (*Capsicum Annuum* L.) 재료는 밀양재래 품종을 사용하였으며 목원대 김문자교수 실험실에서 시료를 확보하였다. 약의 채취 방법, 소포자 분리 및 확보, 소포자 전처리과정, 소포자 배양 방법은 목원대에서 사용하는 방법을 이용하였다 (Kim et al. 2007a).

고추 소포자의 Kanamycin 및 Cefotaxim 내성 조사

소포자 형질전환을 위해 전처리가 완료된 소포자를 이용하여 Kanamycin과 Cefotaxime 두 종류의 항생제 내성 정도를 농도별로 screening 하였다. 형질전환에 사용되는 선발 마커는 *NPTII* 유전자를 이용하기 때문에 전처리 과정을 거친 소포자에 Kanamycin 적응력을 시험하고자 0, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L 농도로 처리 하였다. *Agrobacterium*의 오염 및 성장을 억제시키기 위한 Cefotaxime은 0, 50, 100, 200 mg/L 농도로 처리하였다. 각각의 처리구에 대하여 배양 2일째와 6일째에 소포자의 활력을 FDA 용액을 이용하여 조사하였다 (Kim et al. 2007a).

*Agrobacterium*을 이용한 소포자 형질전환

밀도가 2×10^5 /mL인 소포자를 90 x 15 mm Petri dish에 8 ml씩 분주하여 31°C에서 3일간 암상태에서 배양하였다. 형질전환에 사용한 벡터에는 GFP 유전자인 *mGFP5-ER* (Haseloff et al. 1997)를 함유하고 있으며 *Agrobacterium* strain EHA105에 transformation 시켰다. *Agrobacterium* EHA105를 공동배양하기 위해서 *Agrobacterium*을 OD_{600nm} 값 0.2까지 배양한 후 200 μ M acetosyringone을 넣고, 전처리가 완료된 2×10^5 /mL인 소포자를 sucrose가 포함된 NLNS 치상배지 (Kim et al. 2007) 내에서 8 mL의 소포자에 40 μ l의 *Agrobacterium*을 접종하여 1일간 25°C 조건에서 공동배양하였다. 공동배양 후 500 mg/L의 cefotaxime이 함유된 치상배지로 3회 1000 rpm으로 씻어주었다. Kanamycin 2 mg/L, cefotaxime 400 mg/L 함유된 NLNS 치상배지에 소포자 0.5×10^5 /mL의 밀도로 3 mL씩 60 x 15 mm의 Petri dish에 분주하여 25°C 암배양을 통하여 소포자 배를 유도하였다. 치상배지 7-14일 경과부터 형광현미경의 GFP filter (510-550 nm)를 이용하여 GFP 유전자의 발현을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Kanamycin과 Cefotaxime 농도에 따른 소포자 활력조사

형질전환에 사용한 벡터 pmGFP5-ER에는 선발 마커인 *NPTII* 유전자를 함유하고 있어서 전처리 과정을 거친 소포자에 Kanamycin 적응력을 시험하고자 0, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L 농도로 처리 하였다. 밀도가 2×10^5 /mL인 소포자를 90

x 15 mm Petri dish에 8 ml 씩 분주한 후 2일간 배양하였을 때 Kanamycin 농도에 상관없이 소포자 활력이 동일하게 나타났다 (Figure 1A). 배양 6일 째는 농도가 Kanamycin 20 mg/L 이후서부터 소포자 활력이 2배 이상 감소되었다 (Figure 1B). 배양 28일 후 최종 배 유도율을 조사한 결과 Kanamycin 농도가 높아질수록 배 유도 발생에 심각한 영향을 주는 것으로 나타났다 (Figure 1C). Kanamycin 농도 10 mg/L에서 배 발생율이 4배 이하로 떨어졌으며 100 mg/L에서는 Kanamycin 처리하지 않은 실험구 보다 약 10배 이상으로 배발생이 저해되었다. 일반적으로 자엽이나 배축을 이용하여 Kanamycin 처리를 해서 항생제 적응 실험을 한 경우 Kanamycin 농도를 100 mg/L로 처리하면 0 mg/L에 비해 신초발생율이 약 90-100% 정도 감소한다. 그리고 Kanamycin 농도 60-80 mg/L에서 고정하여 신초발생을 유도하면 신초발생율이 약 20-50% 정도 유지되면서 형질전환율도 안정된다 (Lee et al. 2004). 반면에 소포자 배양시 Kanamycin을 이용하여 selection하는 경우, Kanamycin 농도 50 mg/L 정도에도 약 8배 정도 배발생이 감소됨으로서 selection pressure가 매우 높기 때문에 소포자 배양에 Kanamycin을 이용한 선발은 쉽지 않을 것으로 사려된다.

*Agrobacterium*의 오염 및 성장을 억제시키기 위한 Cefotaxime 은 0, 50, 100, 200 mg/L 농도로 처리하였다. 각각의 처리구에 대하여 배양 2일째와 6일째에 소포자의 활력을 조사하였다 (Figure 2A&B). 소포자를 2, 6일 각각 배양하였을 때 소

포자 활력의 차이는 거의 없었다. 그러나 배양 28일 째의 배 발생에서는 Cefotaxime 200 mg/L에서의 처리가 Cefotaxime 0 mg/L에서의 실험구 보다 약 4배 정도의 감소를 나타냄으로서 *Agrobacterium*의 오염을 제거하고자 Cefotaxime을 200 mg/L 이상으로 사용하면 배발생 유도가 감소할 것으로 사려된다 (Figure 2C). 따라서 형질전환체의 selection pressure와 *Agrobacterium*의 오염 제거를 위하여 공동으로 Kanamycin과 Cefotaxime을 사용할 경우 배발생 유도가 쉽지 않을 것으로 판단되며 이를 극복하기 위해서 Kanamycin을 이용한 선발 배양 보다는 GFP reporter gene을 사용하여 선발하는 것이 바람직하다.

*Agrobacterium*을 이용한 소포자 형질전환

목원대 김문자교수 실험실에서 성공적으로 구축한 고추 소포자를 이용한 배발생 시스템을 답습하여 본 실험실에서 소포자 배 발생을 재현하였고 고추 육묘까지 만들었다 (Figure 3). 이런 시스템에다 *Agrobacterium* 공동배양을 적용하여 소포자에 *Agrobacterium*-mediated genetic transformation이 가능한지를 조사하기 위하여 소포자 형질전환을 구축하고자 하였다. 형질전환에 사용한 벡터는 GFP 유전자가 함유된 pmGFP5-ER이며 *Agrobacterium*과 공동배양 후 배발생 유도 배지에서 치상한 후 소포자가 배로 발생하는 과정을 현미경으로 조사하였다. 소포자는 배양 12일 째서부터 소포자 분열로 cluster를 형성하였으며 24일째에는 반복되는 분열을

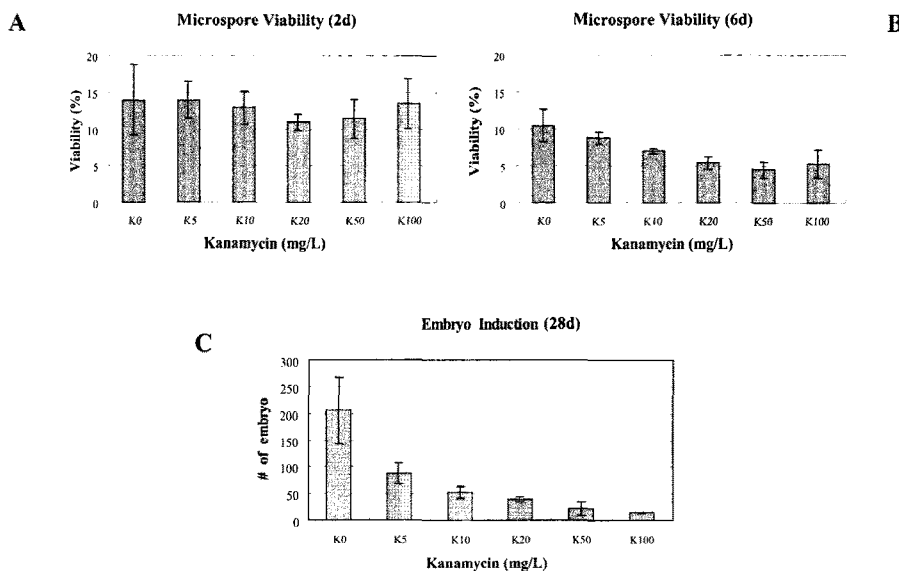


Figure 1. Microspore viability and embryo induction after incubating in Kanamycin media. A: 2 days after incubation; B: 6 days; C: 28day.

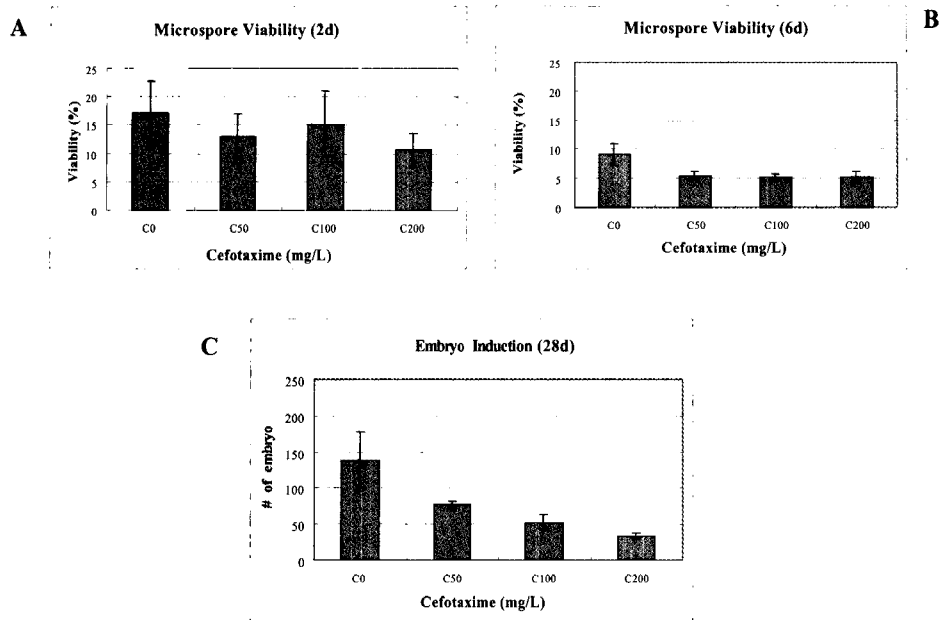


Figure 2. Microspore viability and embryo induction after incubating Cefotaxime media. A: 2 days after incubation; B: 6 days; C: 28days.

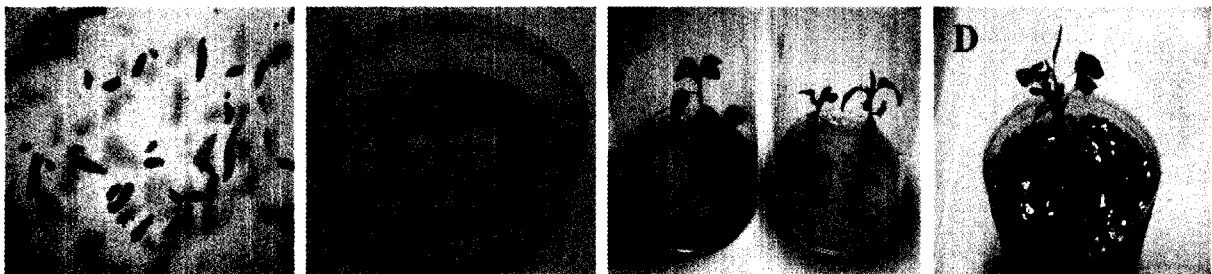


Figure 3. Development of embryos and pepper plants from isolated microspores. A: embryo development; B: root induction; C: seedling; D: acclimated pepper

통하여 큰 mass로 변해있는 배로 발달된 모습을 볼 수 있었다 (Figure 4).

0.5 x 10⁵/mL 농도인 소포자를 90 x 15 mm petri-disch에 8 mL 씩 총 40개 plate를 배양하여 screen 하였다. 소포자로부터 4일, 8일, 24일, 48일째 배발생 과정을 관찰하면서 GFP filter를 이용하여 GFP 발현을 조사하였다. 40개 plate를 조사한 결과 총 120개의 소포자에서 GFP 발현을 볼 수 있었다. Figure 5에서 보는 것처럼 non-transformed 소포자 (24일째)는 GFP filter에서 GFP 발현이 관찰되지 않았으며 형질전환을 시킨 실험구에서는 4일째서부터 GFP filter를 통하여 GFP가 관찰되었다. 8일째 cluster에서는 GFP 발현이 뚜렷하게 보이며 24일째 초기 유도배에서는 전 부위가 GFP로 발현되었다.

Agrobacterium 공동배양 이후 48일째 된 배 총 18개가 정상적으로 성장을 하지 못하는 미성숙배로 관찰되었다. 이들

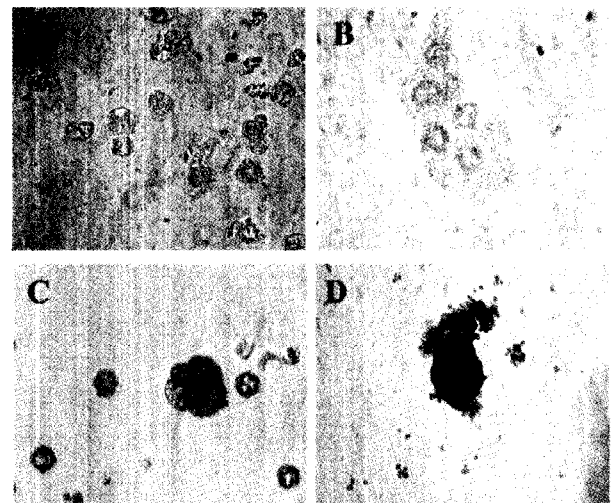


Figure 4. Development of embryos developed from isolated microspores after *Agrobacterium* co-culture. A: 4 days after *Agrobacterium* co-culture; B: 8 days; C: 12 days; D: 24 days

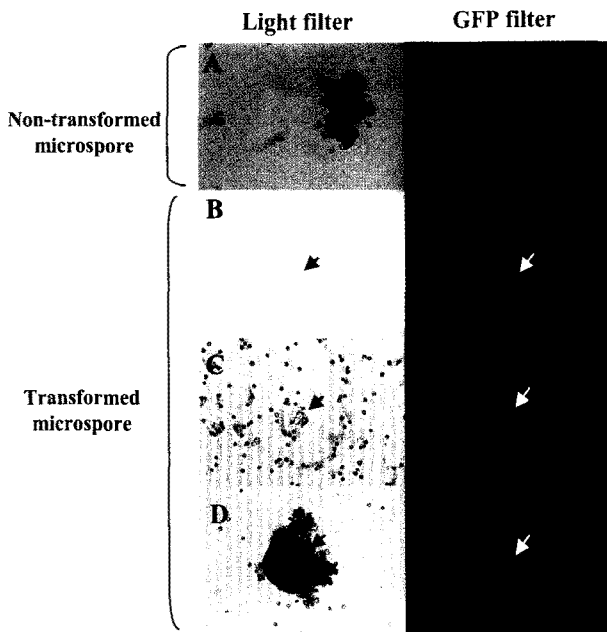


Figure 5. GFP expression of embryos developed from isolated microspores after *Agrobacterium* co-culture. A: non-transformed microspores at 24 days; B: 4 days after *Agrobacterium* co-culture; C: 12 days; D: 24 days

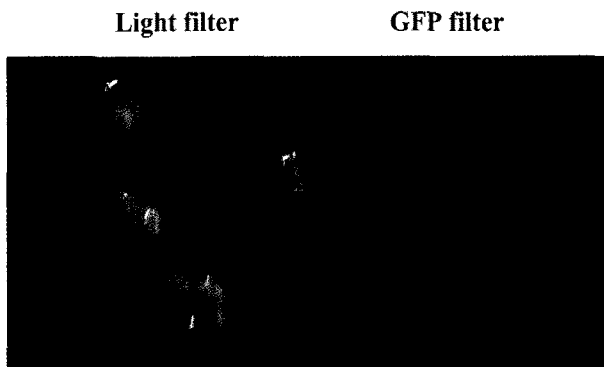


Figure 6. GFP expression of embryo mass developed from isolated microspores after *Agrobacterium* co-culture.

중에서 GFP 발현이 계속 유지되는 배는 8개 이었으며 같은 배지에서 나머지 10개의 배는 GFP 발현이 되지 않았다 (Figure 6). 따라서 GFP 발현된 미성숙 배는 GFP gene이 삽입된 것이며 GFP 발현이 되지 않은 미성숙배는 유전자 삽입이 되지 않은 것으로 사려 된다.

GFP 발현이 미성숙배에서 확실하게 나타남과 동시에 여러 개체가 발견됨으로서 재현성이 있다는 결론이다. 따라서 본 논문은 GFP 유전자가 *Agrobacterium* 공동배양에 의해서 소포자에 삽입되어 소포자 형질전환이 가능하다는 고무적인 결과를 보여주고 있다. 그러나 미성숙배는 더 이상 자라지 않고 그 상태에서 성숙이 멈추었기에 그 이후의 정상적

인 배 발생 조건이 필요하며 실제로 배를 통한 고추의 재분화를 구축하고 PCR과 Southern 등을 통해서 형질전환체임을 증명해야 할 것이다.

적 요

Agrobacterium 공동배양을 적용하여 소포자에 *Agrobacterium*-mediated genetic transformation이 가능한지를 조사하기 위하여 소포자 형질전환에 대한 조건을 구축하고자 하였다. 선발 배지에서 Kanamycin에 대한 소포자의 배발생율을 조사하였는데 Kanamycin 농도 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L를 처리하였을 때 배발생율이 각각 4배, 8배, 10배 이하로 감소하였고 Kanamycin이 형질전환 선발마커로 사용할 경우 형질전환율이 매우 낮아질 것으로 사려 된다. GFP 유전자 발현을 이용하여 visual reporter로서 활용하고자 *Agrobacterium*과 공동배양 후 배발생 유도 배지에 치상하고 소포자가 배로 발생하는 과정을 현미경으로 조사하면서 GFP 발현을 관찰하였다. 소포자는 배양 12일째서부터 소포자 분열로 cluster를 형성하였으며 24일째에는 반복되는 분열을 통하여 큰 mass의 배로 발달된 모습을 각각 GFP 발현을 통해 볼 수 있었다. 배양 48일째도 GFP 발현이 계속 보이며 총 8개의 배에서 GFP 발현 재현성을 보임으로서 형질전환은 된 것으로 보이지만 더 이상 성숙된 배로 자라지 않아 소포자를 이용한 *Agrobacterium* 형질전환 조건을 더 개선할 필요가 있다.

사 사

이 논문은 한국과학재단 (R01-2005-000-10338-0)과 과학기술부 21C 프론티어 작물유전체기능연구 사업단 (CG3133)의 지원을 받아 수행하였습니다.

인용문헌

- Haseloff J, Siemering K, Prasher D, Hodge S (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of greenfluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2122-2127
- Jähne A, Decker D, Brettschneider R, Lörz H (1994) Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theor Appl Gene* 89: 525-533
- Kim KM, Song IJ, Baenziger PS (2007) Effect of promoter

- on transient GUS expression in microspore-derived embryos of wheat. *Kor J Breed Sci* 39(3): 302-308
- Kim MZ, Jang IC, Kim JA, Park EJ, Yoon MC, Lee YW (2007a) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27: 425-434
- Lee YH, Kim HS, Kim JY, Jung M, Park YS, Lee JS, Choi SH, Her NH, Lee JH, Hyung NI, Lee CH, Yang SG, Ham CH (2004) A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. *Plant Cell Rep* 23: 50-58
- Lee JS, Park EJ, Kim MZ (2007) Influence of donor plant growth condition, microspore isolation method, culture medium, and light culture on the production of embryos in microspore culture of hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Kor J Plant Biotech* 34: 363-373
- Park EJ, Kim JA, Lee JS, Jang IC, Yoon MC, Chung SH, Kim MZ (2005) The influence of pretreatment period, 2-hydroxynicotinic acid, and anther co-pretreatment on embryo induction in isolated microspore culture of *Capsicum annum* L. *Kor J Plant Biotech* 32: 37-44
- Soniya EV, Banerjee NS, Das MR (2001) Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *Current Science* 80: 1213-1215
- Stöger E, Fink C, Pfosser M, Heberle-Bors E (1995) Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen. *Plant Cell Rep* 14: 273-278

(접수일자 2008년 1월 28일, 수리일자 2008년 4월 2일)