다양한 계통의 옥수수 미성숙배로부터 캘러스 유도과 식물체 재분화

홍준기 · 박기진 · 이강섭 · 김둘이 · 김주곤 · 이승범 · 서은정 · 이연희

Callus induction and plant regeneration from immature zygotic embryos of various maize genotypes (*Zea mays* L.)

Joon Ki Hong · Ki Jin Park · Gang-Seob Lee · Dool Yi Kim · Ju-Kon Kim · Seung Bum Lee · Eun Jung Suh · Yeon-Hee Lee

Received: 6 February 2017 / Revised: 27 March 2017 / Accepted: 28 March 2017
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract We investigated the callus induction and plant regeneration ability of 16 maize genotypes, including the Korean inbred lines, using 9 to 15 day-old immature zygotic embryos from maize grown in pots and from field cultures. Immature zygotic embryos placed on MS medium supplemented with L-proline 0.7 g/L, MES 0.5 g/L, Dicamba 1.5 mg/L, 2,4-D 0.5 mg/L, AgNO₃ 4 mg/L, and sucrose 20 g/L, showed the highest frequency of callus induction. The highest number of shoots regenerated when the embryogenic callus were transferred to MS medium supplemented with 5 mg/L zeatin. The root formation was observed when shoots were grown on MS medium supplemented with 0.2 mg/L indole-3-butyric acid (IBA). Additionally, under the same culture conditions, immature zygotic embryos from maize

grown in the field also had a high frequency of plant regeneration. Except one genotype, 15 genotypes showed callus induction and shoot regeneration. Among the 16 genotypes tested, H99, B98, HW3, and B73 yielded the best plant regeneration. H99 showed maximum shoot formation from the primary embryogenic callus. The results suggest that genotypes and growth conditions of the maize plant plays very important roles for enhancing the embryogenesis competence of immature zygotic embryos. The successful regeneration from immature zygotic embryos of maize inbred lines provides a basis for molecular breeding of new cultivars by genetic transformation.

Keywords Callus induction, Embryogenesis, Genotype, Maize, Molecular breeding, Regeneration

J. K. Hong · G.-S. Lee · S. B. Lee · E. J. Suh · Y.-H. Lee (✉)
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부
(Agricultural Biotechnology Department, National Institute of
Agricultural Sciences, Rural Development Administration, 370
Nongsaengmyeong-ro, Jeonju-si, Jeollabuk-do, 54874, Korea)
e-mail: yhl2222@korea.kr

K. J. Park
강원도 농업기술원 옥수수연구소
(Maize Experiment Station, Gangwondo Agricultural Research
and Extension Services, Hongcheon, 25160, Korea)

D.Y. Kim
농촌진흥청 국립식량과학원 작물기초기반과
(Crop Foundation Research division, National Institute of Crop
Science, Rural Development Administration, 181 Hyeoksin-ro,
Iseo-myeon, Wanju-Gun, Jeollabuk-do, Korea)

J.-K. Kim
서울대학교 그린바이오과학기술연구원 종자생명과학연구소
(Graduate School of International Agricultural Technology and
Crop Biotechnology Institute/GreenBio Science & Technology,
Seoul National University, Pyeongchang 25354, Korea)

서 언

옥수수는 벼, 밀과 더불어 세계 3대 작물 중의 하나로 전세계에서 재배되고 있는 작물이다. 옥수수 식물체 모든 부위가 식용, 사료 작물뿐만 아니라 에너지, 산업소재, 제약 원료 등으로 여러 분야에 사용된다. 또한 단자엽 식물에서 유전학, 유전체학, 분자생물학 연구를 위한 중요한 모델 작물이기도 하다. 1990년대 중반 이후로 옥수수에 생명공학 기술이 적용된 GM 옥수수가 개발되어 해충저항성 및 제초제 저항성 옥수수 재배 면적은 세계적으로 꾸준히 증가되고 있다. 최근에 들어서는 기후변화에 대응하기 위해서 생물학적 비생물학적 스트레스에 내성을 갖는 옥수수 품종 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다(Que et al. 2014).

생명공학 기술을 적용하여 신품종 옥수수 개발을 하기 위해서는 옥수수 조직으로부터 온전한 식물체의 재분화는 필수적인 단계라고 할 수 있다. 옥수수의 미성숙 배, 성숙 배, 잎, 약 등 여러 다양한 기관이나 조직으로부터 식물체 재분화에 대한 연구가 오랫동안 수행되어 왔다. 옥수수 미성숙 배로부터 식물체 재분화가 Green and Philips (1975)에 의해 처음 보고된 이후로 다양한 품종의 미성숙 배로부터 식물체 재분화 연구가 지속적으로 보고되었다(Armstrong and Green 1985; Duncan et al. 1985; Songstad et al. 1988; Bohorova et al. 1995; Carvalho et al. 1997; El-Itriby et al. 2003; Wang et al. 2007; Binott et al. 2008; Ombori et al. 2008; Rakshit et al. 2010; Anami et al. 2010; De-yi et al. 2011; González et al. 2012; Ali et al. 2014). 미성숙 배 외에도 성숙 배(Wang 1987; Huang and Wei 2004; Al-Abed et al. 2006; Abebe et al. 2008; Jia et al. 2008; Zhao et al. 2008), 중배축(mesocotyl) 조직(Torne et al. 1980), 약(Ting et al. 1981), 유묘의 마디부분(Santos et al. 1984; Sidorov et al. 2006), 잎(Conger et al. 1987; Ahmadabadi et al. 2007), 영(glume)(Suprasanna et al. 1986), 화서(미성숙 tassel과 ears) 절단 조직(Pareddy and Petolino 1990; Songstad et al. 1992), shoot-tip 분열 조직(Li et al. 2004)에서 캘러스 형성 및 식물체 재분화가 이루어졌다. 이렇게 옥수수의 여러 다양한 조직으로부터 식물체 재분화가 이루어졌으나 지금까지 미성숙 배를 사용하였을 때 재분화 효율이 가장 높은 것으로 알려져 왔다. 그러나 특정 계통에서는 상당히 높은 재분화율을 나타내지만 그 밖의 계통에서는 재분화가 되지 않거나 대단히 낮은 재분화율을 보였고(Hodges et al. 1986), 이러한 계통들의 genotype에 따라 식물체 재분화 능력에 큰 차이를 나타낸다고 알려져 왔다. 특히 Hodges et al. (1986)은 식물체 재분화 능력이 우수한 계통과 잘 되지 않는 계통들과의 교배로 나온 F1 hybrid로부터 재분화가 유도되는 결과를 보고하였고 옥수수에서 genotype이 배 형성 캘러스 및 재분화에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔다. 그 예로 스페인 지역의 9개 품종 옥수수 성숙 종자로부터 발아한 유묘의 마디 부분을 사용하였을 때 H-113 한 품종에서만 재분화가 이루어졌다(Santos et al. 1984). Duncan et al. (1985)은 재분화 능력이 있는 계통과 교배되어 나온 hybrid에서만 재분화가 되었으며 101개의 순계 계통 중 49%인 49개, 218개의 순계 계통 중 B73, H99, Mo17, B84, A632 등 199개 계통에서 식물체 재분화가 이루어졌다고 보고하였다. 열대 지역에 있는 총 113개의 옥수수 순계 계통의 미성숙 배로부터 캘러스 형성 및 재분화는 42계통에서만 이루어졌으며(Carvalho et al. 1997), 중국 쓰촨 농업대학교에서는 70개의 옥수수 순계 계통의 미성숙 배로부터 캘러스 형성 및 재분화율이 있는 10개 계통을 선발하여 이들에 대한 아그로박테리움 감염도를 조사하였다(Wang et al. 2007). Binott et al. (2008)은 케냐 지역의 12개 순계 계통과 이들과의 교배로 나온 hybrid의 미성숙 배로부터 캘러스 형성 및 재분화를 조사한 결과 4개의 순계 계통과

3개의 hybrid에서만 재분화를 나타냈다고 보고하였다. 또한 좋은 농업 형질을 갖고 있으면서 재분화 능력이 높은 계통 선발을 위해서 아르헨티나 지역에 있는 48개의 순계 계통을 조사한 결과 14계통에서 식물체 재분화 현상을 보였다(González et al. 2012). 이러한 연구 결과로 볼 때 옥수수의 경우 식물체 재분화 능력은 생장조절제 종류, 농도, 배양 조건 외에 genotype이 가장 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 따라서 생명공학을 이용하여 우수한 옥수수 품종을 개발하기 위해서는 순계 계통에 따른 식물체 재분화율 조사가 필수적이라고 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 국내 환경에서 국내외 옥수수 계통들의 미성숙 배로부터 식물체 재분화 능력과 식물체의 재배 상태에 따른 재분화 효율을 조사하여 형질전환을 위한 최적의 순계 계통을 선발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

옥수수 품종은 국내 5계통, 국외 11계통 총 16계통을 국립식량과학원, 강원도 농업기술원 옥수수연구소, 미국 USDA (United States Department of Agriculture)로부터 분양 받아 사용하였다(Table 2). 식물체를 재배하는 방법에 따른 미성숙 배로부터 식물체 재분화율을 조사하기 위하여 옥수수를 4월과 10월 사이에 12각 32 cm 포트(pot)와 포장(field)에서 재배하여 미성숙 배를 확보하였다. 옥수수 종자는 물에 잠길 정도로 침지하여 25~28°C에서 발아시켰다. 발아 후 2~3일 때 상토 9: 펄라이트 1 비율로 혼합한 토양이 있는 50공 포트에 옮겨 심은 후 잎의 길이가 15~20 cm가 되면 포트와 포장으로 이식하여 재배하였다. 수분(pollination)은 최적의 수분율을 보이는 것으로 알려진 아침 8~10시 사이, 20~24°C에서 하였다. 품종별, 환경에 따라 약간의 차이는 있으나 대체적으로 수분 후 9~15일 이내에 1.2~2.0 mm 크기의 최적 미성숙 배를 추출하여 식물체 재분화율 조사에 사용하였다.

미성숙배 분리

수분 후 9~15일째 된 미성숙 옥수수(ear)의 껍질과 수염을 깨끗이 제거한 후 원통형 병(지름 8 cm × 길이 20 cm)에 넣고 70% 에탄올로 5분 동안 처리한 후 멸균수로 2분간 2회 세척하였다. 50%로 희석한 상업용 락스(4.4% NaOCl)에 Tween 20을 소량 첨가한 용액에서 15~20분 처리한 후 멸균수로 2분간 5회 세척하여 표면 살균하였다. 소독된 옥수수 ear를 4°C에서 최대 3일까지 보관하여 미성숙 배 분리에 사용하였다.

수술용 칼날 15번(Scalpel Blade No. 15)을 이용하여 옥수

수 낱알(kernel)을 분리한 후 횡축이나 사선으로 얇게 절단하였다. 칼날을 미성숙 배로부터 먼 쪽 방향으로 넣은 후 조심스럽게 힘을 주어 미성숙 배를 분리하였다. 실온에서 최대 1~2시간 이내 150~300개의 미성숙 배를 분리할 수 있었다. 분리된 미성숙 배에 있는 옥수수 전분을 제거하기 위해서 N6 세척 배지(N6 배지, Casamino acid vitamin assay 1 g/L, Sucrose 68.46 g/L, Glucose 36.04 g/L, Dicamba 1.5 mg/L, 2,4-D 0.5 mg/L, pH5.2)가 들어 있는 2 mL micro-centrifuge tube에 넣어 2~3회 세척하였다.

캘러스 유도 및 식물체 재분화

옥수수 미성숙배로부터 캘러스 형성 및 재분화를 위해 Ishida 등(2007)이 보고한 배지를 변형하여 본 실험에 사용하였다. 미성숙 배를 캘러스 유도 배지(MS 배지, L-proline 0.7 g/L, MES 0.5 g/L, Dicamba 1.5 mg/L, 2,4-D 0.5 mg/L, AgNO₃ 4 mg/L, Sucrose 20 g/L, Gelrite 4 g/L, pH 5.8)에 배반(scutellum)이 위쪽을 향하게 하여 Petri-dish 당 25개 미성숙 배를 치상하였다. 옥수수 계통당 최소 50개 이상의 미성숙 배를 캘러스 형성 및 재분화를 조사에 사용하였다. 캘러스 유도 배지에 치상된 미성숙 배는 28°C, 암 상태에서 캘러스 크기가 1.5~2.0 cm 될 때까지 2주 간격으로 계대배양하였다. 유도된 캘러스를 2~3 조각(5~7 mm 정도)으로 분해한 후 재분화 배지(MS 배지, CuSO₄ 1.22 mg/L, MES 0.5 mg/L, Zeatin 0.5 mg/L, Sucrose 20 g/L, Gelrite 4 g/L, pH 5.8)에 치상하여 광 조건(약 6000 lux, 16시간 광주기)하에서 배양하였다. 10일 후 캘러스에 녹점이 형성되면서 신초가 발생하기 시작하면 새로운 재분화 배지로 계대배양하였다. 신초 크기가 5~7 cm 정도 되고 뿌리가 나올 때 뿌리 발생 및 생장을 촉진시키기 위하여 0.2 mg/L IBA가 포함된 MS 배지로 옮겼다. 7~14일 후 뿌리 발생이 왕성하고 완전한 식물체가 되면 포트에 이식하여 순화 후 온실에서 재배하였다.

결과 및 고찰

세계에서 주요 작물 중의 하나인 옥수수는 GM 작물 개발 및 재배 면적(2014년 184백만 ha, Clive 2014)을 가장 많이 차지하고 있다. 유용 유전자 및 이를 활용한 형질전환 기술로 옥수수 신종 개발을 하기 위해서는 식물 조직으로부터 식물체 재분화가 기본적으로 이루어져야 한다. 옥수수의 여러 조직으로부터 재분화 연구가 시도되었으나 미성숙 배로부터의 재분화 효율이 가장 높은 것으로 알려져 있으며 이를 이용한 형질전환이 가장 많이 이루어지고 있다. 옥수수의 경우 동일 종이라 하더라도 유전적 또는 환경적 요인에 따라 캘러스 유도율과 식물체로의 재분화에는 현저한 차이가 있기 때문에 광범위한 선별 연구를 통해서 우수한 계통

을 선발하는 과정은 필수적인 것으로 알려져 있다(Hodges et al. 1986; Cho et al. 2005; Wang et al. 2007; Binnot et al. 2008; González et al. 2012). 따라서 본 실험은 국외에서 형질전환에 사용 중인 H99와 A188등을 포함한 국외 11 계통과 국내 5 계통(강다옥 모 KS140과 부 KS141, 광평옥 모 KS124와 부 KS85 계통, HW3) 총 16 계통을 사용하여 국내 환경에서 재배된 옥수수 미성숙 배로부터 캘러스 형성 및 식물체 재분화율을 조사하였다.

식물체를 재배하는 방법에 따른 옥수수 미성숙 배로부터 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 조사하기 위하여 4월 초부터 10월까지 동일 시기에 옥수수를 포트와 포장에서 재배하였다. 재분화에 적합한 크기로 알려진 1.2~2.0 mm 미성숙 배는 계통 및 환경에 따라 차이는 있었으나 수분한 후 9~15일째 얻을 수 있었다. 포트 재배는 12 계통(HiII A, HiII AxHi II B, H99, B104, A188, B73, HW3, B70, B79, B84, B85, B98)에 대하여 캘러스 유도율과 재분화율 조사를 실시하였다. 포트에서 재배한 옥수수로부터 분리된 미성숙 배에서는 82-98%의 높은 빈도로 캘러스 유도율을 나타내었다(Table 1). 식물체 재분화는 B73, B85 계통을 제외한 10 계통에서 이루어졌다. 식물체 재분화율은 B98>Hi II A>H99>B79>Hi II AxHi II B, A188>B70>HW3>B84>B104 순으로 나타났고 가장 높은 재분화율을 보인 계통은 B98로 64.4%였다. B73과 B85 계통은 캘러스 형성이 98%, 96%로 높았으나 재분화는 본 실험에서 사용된 배지 조건에서는 이루어지지 않았다(Table 1).

포장 재배는 확보한 옥수수 16계통(HiIIA, HiII AxHi II B, H99, B104, A188, B73, HW3, B70, B79, B84, B85, B98, KS140, KS141, KS124, KS85) 전 품종에 대해서 실시하였는데 HiIIA와 B104 품종은 환경 요인으로 포장 재배에 실패하여 미성숙 배를 얻지 못하여 14품종에 대해서만 캘러스 유도율과 재분화율 조사를 하였다. 포장에서 재배한 옥수수 미성숙 배로부터 캘러스 형성율은 66-100%였다(Table 2). B79와 B85 계통의 미성숙 배로부터 캘러스 형성율은 94%, 72%였으나 이 후 식물체 재분화가 되지 않았다. 이들을 제외한 12 계통의 미성숙 배로부터는 캘러스 형성과 식물체 재분화가 이루어졌다. 식물체 재분화율은 H99>B98>B73, HW3>A188>Hi II AxHi II B>B84>KS141>B70>KS124>KS140>KS85 순이었고 H99와 B98 계통이 74%, 68%로 높은 재분화율을 보였다(Table 2). 재분화율이 가장 낮은 KS85 계통은 1개의 신초가 발생되었으나 뿌리가 발생되지 않고 갈변하였다(Fig. 1). 포트 재배와 포장 재배를 비교해 보았을 때 옥수수 미성숙 배로부터 캘러스 형성은 모든 계통에서 유도되었으나 식물체 재분화율에는 크게 영향을 주는 것으로 나타났다. 특히 B73 계통은 포트 재배 시 분리된 미성숙 배로부터 캘러스 형성은 높았으나 식물체 재분화가 일어나지 않는 반면 포장에서 재배된 식물체로부터 분리된 미성숙 배로부터는 52%의 재분화율을 보였다. 또한 B79 계통은 포트 재배에서

Table 1 Callus induction and plant regeneration from excised immature embryos on maize pot culture

Genotypes	No. of immature embryos cultured (A)	No. of callus forming embryos	Callus induction frequency (%)	No. of shoots (B)		Regeneration frequency (B/A %)	
				Zeatin 5 mg/L	Zeatin 0 mg/L	Zeatin 5 mg/L	Zeatin 0 mg/L
HIII A	50	46	92	22	20	44	40
IIIIA _x IIIIIB	100	98	98	24	23	24	23
H99	70	68	97	19	9	27	12.8
B104	74	61	82	NS	2	NR	2.7
A188	50	42	84	12	8	24	16
B73	50	49	98	NS	NS	NR	NR
HW3	50	49	98	3	9	6	18
B70	80	49	98	18	9	23	11.3
B79	67	61	91	17	13	25.3	19.4
B84	60	59	98	3	1	5	1.6
B85	165	159	96	NS	NS	NR	NR
B98	59	57	96	38	24	64.4	40.6

NS, no shoots; NR, no regeneration.

Table 2 Callus induction and plant regeneration from excised immature embryos on maize field culture

Genotypes	No. of immature embryos cultured (A)	No. of callus forming embryos	Callus induction frequency (%)	No. of shoots (B)		Regeneration frequency (B/A %)	
				Zeatin 5 mg/L	Zeatin 0 mg/L	Zeatin 5 mg/L	Zeatin 0 mg/L
HIII A	-	-	-	-	-	-	-
IIIIA _x IIIIIB	59	39	66	18	14	30.5	23.7
H99	50	49	98	37	4	74	8
B104	-	-	-	-	-	-	-
A188	50	46	92	18	20	36	40
B73	107	107	100	56	47	52	43.9
HW3	50	47	94	5	26	10	52
B70	200	174	87	23	10	11.5	5.0
B79	153	144	94	NS	NS	NR	NR
B84	187	184	98	52	46	27.8	24.5
B85	71	51	72	NS	NS	NR	NR
B98	171	120	99	117	107	68.4	62.5
KS140	200	195	98	11	4	5.5	2
KS141	254	245	96	67	43	26	16.9
KS124	35	24	69	3	NS	8.5	NR
KS85	112	110	98	1	NS	0.9	NR

NS, no shoots; NR, no regeneration.

분리된 미성숙 배로부터 식물체 재분화가 있었으나 다른 계통과는 다르게 포장에서 재배된 식물체로부터 분리된 미성숙 배에서는 식물체 재분화가 이루어지지 않았다. B73과 B79 계통은 재배 방법에 따라 재분화율에 상당한 차이를 보

였는데 이 계통들은 미성숙 배의 상태가 옥수수 영양 생장에 영향을 주는 재배환경에 더 민감하게 작용하는 것으로 사료된다. B85 계통은 포트와 포장 재배되어 분리된 미성숙 배로부터 캘러스 형성은 되었으나 캘러스가 갈변하면서 신

Fig. 1 Callus induction and plant regeneration from immature zygotic embryos of maize lines (A). NS, no shoots; NR, no roots. Bars are 1 cm. Classification of different types of embryogenic callus (B). Black arrowheads indicate embryogenic callus. Red arrowheads indicate non-embryogenic and watery callus

초 형성이 전혀 일어나지 않았다(Table 2, Fig. 1). 대체적으로 포트 재배보다는 포장에서 재배된 옥수수로부터 분리된 미성숙 배로부터의 식물체 재분화율이 상당히 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과로 볼 때 미성숙 배를 분리할 때의 옥수수 영양 성장 상태가 중요하다는 것을 알 수 있는데 한정된 양의 토양이 존재하는 포트보다 포장에서 옥수수의 성장 발달 양상이 우수한 것으로 나타났으며 이로부터 분리한 미성숙 배의 캘러스 형성 및 재분화율이 높게 나타난 것으로 사료된다. 따라서 옥수수의 genotype 뿐만 아니라 옥수수를 재배하는 환경, 미성숙 배를 분리할 때의 옥수수 상태가 배발생 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 중요하게 영향을 준다는 것을 보여준다.

본 실험에서 사용된 캘러스 유도 및 재분화 배지는 Ishida 등(2007)이 아그로박테리움을 이용한 옥수수 미성숙 배 형질전환 시 사용된 배지를 일부 변형하여 사용하였다. 미성

숙 배로부터 캘러스를 유도하기 위해서 생장조절제 종류와 농도(2,4-D 0.5 mg/L 와 Dicamba 1.5 mg/L)는 동일하게 사용하였으며 이 조건에서 모든 계통의 미성숙 배로부터 캘러스 형성은 높은 비율로 유도되었다. 이렇게 유도된 캘러스를 생장호르몬이 포함되지 않은 배지와 5 mg/L Zeatin이 포함된 배지에서 재분화율을 조사한 결과 대부분의 계통에서 Zeatin이 포함된 배지에서 더 높았다. 그러나 HW3의 경우에는 생장호르몬이 포함되지 않은 배지에서 더 높은 재분화율을 나타냈다(Table 1, 2).

옥수수 미성숙 배로부터 형성된 캘러스는 type I 과 type II로 분류된다고 알려져 있다(Armstrong and Green 1985). Type I 캘러스는 단단하고 치밀한 하얀색을 띄며 증식속도가 다소 느린 특징을 보이고, type II 캘러스는 투명하고 부드러운 연노란색의 특징을 나타낸다고 하였다. 본 실험에서도 배양 5-7주 후 캘러스 형태를 조사한 결과 H99, B70, B84, KS85, KS140, KS124 계통에서는 부정형의 세포덩어리가 혼합되어 있는 캘러스와 단단하고 치밀(compact)하면서 증식 속도가 느린 type I의 하얀 캘러스가 관찰되었다(Fig. 1 B). B104, HiIIA, HiIIA×Hi II B, B98, A188, B73 계통에서는 수분이 많이 포함된 듯한 무른 캘러스와 부드럽고 생장이 빠르며 재분화율이 높은 연노란색의 type II의 캘러스가 관찰되었다(Fig. 1 B). 또한 HW3, B79, KS141 계통에서는 투명하고 부드러운 캘러스와 연노란색의 type II의 캘러스가 관찰되었다. 이러한 다양한 계통에 따른 캘러스 형태는 기존에 Hi II, H99, A188, B73, HW3 계통에서 보고된 결과와 유사한 경향을 나타내었다(Armstrong and Green 1985; Armstrong et al. 1991; Wan et al. 1995; Cho et al. 2005). 일반적으로 옥수수의 미성숙배로부터 발생하는 type I 캘러스를 사용하여 형질전환을 할 경우 재분화 개체가 비형질전환체일 가능성이 있는 반면 분열능이 높으며 생장이 빠르고 계대배양을 통해서 배발생 캘러스의 형태가 유지되는 type II 캘러스 사용 시 정상적인 종자 수확이 가능한 형질전환체를 생산 할 수 있는 확률이 높다고 알려져 있다(Wan et al. 1995). 그러나 최근 type I의 캘러스에 외래 유전자를 직접 도입하여 재분화할 수 있는 기술이 확립됨으로써 본 실험에서 사용된 계통들에서 유도된 type I과 type II 캘러스의 구분 없이 배발생 캘러스를 이용하여 형질전환이 가능할 것으로 사료된다(Sidorov et al. 2006; Ishida et al. 2007).

본 실험의 전체적인 결과로 볼 때 포장 재배한 옥수수에서 분리한 미성숙 배로부터 캘러스를 유기한 후 Zeatin이 함유된 재분화 배지를 사용할 때 재분화에 더 높은 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 캘러스 당 형성된 신초 수는 재분화가 잘 되는 H99는 3개, HW3는 5개 정도로 비교적 높았고, 나머지 품종들은 1~2개 정도의 신초가 발생되었다(데이터 미제시). 따라서 재분화 효율이 높은 계통일수록 캘러스 당 형성된 신초 발생 수가 높은 것으로 나타났다. 이는 식물체 재분화에는 미성숙 배가 분리되는 옥수수의 재배된

Fig. 2 Normal plantlets and seed set regenerated from immature zygotic embryos of maize lines. Bars are 1 cm

환경과 계통의 차이뿐만 아니라 재분화 배지에 포함되는 cytokinin과 같은 생장조절제의 농도도 중요하다는 것을 나타낸다. 뿌리 배지로 옮긴 후 발근된 소식물체를 약 5~7 cm의 길이로 신장시킨 후 순화하여 화분에 이식하였을 때 성공적으로 생장하였다(Fig. 2). 활착 2주 후 식물체의 지상부가 15~20 cm 이상 신장한 후 식물체는 외관상 정상적인 표현형을 보여주었으며 수분 후 최종적으로 옥수수 종자가 형성된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

유전자 발현을 조절하는 새로운 첨단 생명공학 기술을 옥수수에 적용하기 위해서 식물 조직으로부터 식물체 재분화 체계 확립은 필수적인 단계이다. 본 연구에서 수행한 국내외 옥수수 계통들의 식물체 재분화 효율은 옥수수의 재배 환경과 genotype에 따라 상당한 차이를 보였으며 포장에서 재배한 H99, B98, HW3 및 B73 계통의 옥수수로부터 분리한 미성숙 배 사용 시 대체적으로 높은 식물체 재분화율을 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 향 후 아그로박테리움 등을 이용한 옥수수 형질전환 연구에 중요한 유전자원으로 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

적 요

옥수수의 최적 조직 배양 조건을 확립하기 위하여 옥수수 국내 5 계통과 국외 11 계통 총 16 계통을 포트와 포장 재배하여 미성숙 배를 분리하여 배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화율을 조사하였다. MS 배지에 auxin으로 1.5 mg/L Dicamba와 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 캘러스 형성은 본 실험에 사용된 옥수수 계통 모두에서 높은 빈도로 유도되었

으며, 캘러스로부터 식물체 재분화는 5mg/L zeatin이 첨가된 재분화 배지에서 높은 재분화율을 보였다. 또한 포장에서 재배된 옥수수로부터 미성숙 배를 분리하여 사용하였을 때 캘러스 유기 및 식물체 재분화 효율이 높았던 것으로 보아 미성숙 배를 분리하기 위한 옥수수 상태 및 genotype이 중요한 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. 본 실험을 통하여 배발생 캘러스 형성 및 식물체 재분화 효율이 조사된 옥수수 계통들은 생명공학 기술을 활용한 신품종 개발을 위한 형질전환 시스템 개발에 유전자원으로 활용될 수 있는 정보를 제공할 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21 GM작물개발사업단(과제번호: PJ011135032016)의 지원에 의해 수행되었다. 또한 본 연구는 2017년도 농촌진흥청 국립농업과학원 박사후 연수과정지원사업에 의해 수행되었다.

References

- Abebe DZ, Teffera W, Machuka JS (2008) Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.) from mature zygotic embryo through callus initiation. *Afr J Biotechnol* 7(13):2181–2186
- Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R (2007) A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res* 16:437–448
- Al-Abed D, Rudrabhatla S, Talla R, Goldman S (2006) Split-seed: a new tool for maize researchers. *Planta* 223:1355–1360
- Ali F, Ahsan M, Saeed NA, Ahmed M, Ali Q, Kanwal N, Tehseen MM, Ijaz U, Bibi I, Niazi NK (2014) Establishment and optimization of callus-to-plant regeneration system using mature and immature embryos of maize (*Zea mays*). *Inter J Agric Biol* 16:111–117
- Anami SE, Mgtu AJ, Taracha C, Coussens G, Karimi M, Hilson P, Lijsebettens MV, Machuka J (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 102:285–295
- Armstrong CL, Green CE (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164:207–214
- Armstrong CL, Green CE, Phillips RL (1991) Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genetics Cooperative Newsletter* 65:92–93
- Binnot JJ, Songa JM, Ininda J, Njagi EM, Machuka J (2008) Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis. *Afr J Biotechnol* 7(8):981–987
- Bohorova NE, Luna B, Brito RM, Huerta LD, Hoisington DA (1995) Regeneration potential of tropical, sub tropical, mid

- altitude and highland maize inbreds. *Maydica* 40:275–281
- Carvalho CHS, Bohorova N, Bordallo PN, Abreu LL, Valicente FH, Bressan W, Paiva E (1997) Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Rep* 17:73–76
- Cho M-A, Park Y-O, Kim J-S, Park k-J, Min H-K., Liu J-R, Choi P-S (2005) Yellowish friable embryogenic callus (YFEC) production and plant regeneration from immature embryo cultures of domestic maize cultivars and genotypes (*Zea mays* L.). *Korean J Plant Biotechnol* 32(2):117–121
- Clive J (2014) Global status of commercialized Biotech/GM crops. ISAAA Brief No. 49
- Conger BV, Novak FJ, Afza R, Erdelsky K (1987) Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. *Plant Cell Rep* 6:345–347
- De-yi Z, You-yin Z, L. Qian L, Ti Z, De-gang Z (2011) Production of embryogenic callus and plant regeneration from elite Guizhou waxy maize inbred lines. *Agric Sci China* 10(4): 490–498
- Duncan DR, Williams ME, Zehr BE, Widholm JM (1985). The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 165:322–332
- El-Itriby HA, Assem SK, Hussein EHA, Abdel-Galil FM, Madkour MA (2003) Regeneration and transformation of Egyptian maize inbred lines via immature embryo culture and a biolistic particle delivery system. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 39:524–531
- González GA, Pacheco MG, Oneto CD, Etchart VJ, Kandus MV, Salerno JC, Eyherabide G, Presello D, Lewi DM (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electronic J biotechnol* 15:1–7
- Green CE, Phillips RL (1975) Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci* 15:417–421
- Hodges TK, Kamo KK, Imbrie CW, Becwar MR (1986) Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Nat Biotech* 4:219–223
- Huang XQ, Wei ZM (2004) High frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep* 22:793–800
- Ishida Y, Hiei Y, Komari T (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nat Protocols* 2:1614–1621
- Jia XX, Zhang JW, Wang HN, Kong WP (2008) Efficient maize (*Zea mays* L.) regeneration derived from mature embryos in vitro. *Maydica* 53:239–248
- Li W, Sun G, Liu J, Masilamany P, Taylor JH, Yan W, Kasha KJ, Pauls KP (2004) Inheritance of plant regeneration from maize (*Zea mays* L.) shoot meristem cultures derived from germinated seeds and the identification of associated RAPD and SSR markers. *Theor Appl Genet* 108:681–687
- Ombori O, Gitonga NM, Machuka J (2008) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Biotech* 7:224–232
- Paredy DR, Petolino JF (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. *Plant Sci* 67:211–219
- Que Q, Elumalai S, Li X, Zhong H, Nalapalli S, Schweiner M, Fei X, Nuccio M, Kelliher T, Gu W, Chen Z, Chilton MD (2014) Maize transformation technology development for commercial event generation. *Front Plant Sci* 5:379
- Rakshit S, Rashid Z, Sekhar JC, Fatma T, Dass S (2010) Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 100:31–37
- Santos MA, Torné JM, Blanco JL (1984) Methods of obtaining maize totipotent tissues. I. Seedling segments culture. *Plant Sci Lett* 33:309–315
- Sidorov V, Gilbertson L, Addae P, Duncan D (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Rep* 25:320–328
- Songstad DD, Peterson WL, Armstrong CL (1992) Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). *Am J Bot* 79(7):761–764
- Songstad DD, Duncan DR, Widholm JM (1988) Effect of l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Rep* 7:262–265
- Suprasanna P, Rao KV, Reddy GM (1986) Plantlet regeneration from glume calli of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* 72:120–122
- Ting YC, Yu M, Zheng WZ (1981) Improved anther culture of maize (*Zea mays*). *Plant Sci Lett* 23:139–145
- Torne JM, Santos MA, Pons A, Blanco M (1980) Regeneration of plants from mesocotyl tissue cultures of immature embryos of *Zea mays* L. *Plant Sci Lett* 17:339–344
- Wan Y, Widholm JM, Lemaux PG (1995) Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196:7–14
- Wang AS (1987) Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. *Plant Cell Rep* 6: 360–362
- Wang Y, Fu S, Wen Y, Zhang Z, Xia Y, Liu Y, Rong T, Pan G (2007) Selection of maize inbred lines with high regeneration and susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens*. *J Genet Genomics* 34(8):749–755
- Zhao C, Zhang L, Ge C, Hu K (2008) Establishment and optimization of the regeneration system of mature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Agricult Sci China* 7(9):1046–1051