

국내 옥수수 품종 및 계통의 미숙배 배양으로부터 Yellowish Friable Embryogenic 캘러스 (YFEC) 생산과 식물체 재생

조미애¹, 박윤옥¹, 김진석⁴, 박기진⁵, 민황기⁵, 유장렬³, 최필선^{2*}

¹유진텍부설연구소, ²남부대학교 생약자원학과, ³한국생명공학연구원 식물세포공학실험실, ⁴한국화학연구원, ⁵강원도옥수수시험장

Yellowish Friable Embryogenic Callus (YFEC) Production and Plant Regeneration from Immature Embryo Cultures of Domestic Maize Cultivars and Genotypes (*Zea may L.*)

Mi-Ae Cho¹, Yun-Ok Park¹, Jin-Suck Kim⁴, Ki-Jin Park⁵, Hwang-Ki Min⁵, Jang-Ryol Liu³, Pil-Son Choi^{2*}

¹Eugentech Inc, Taejeon 305-606, Korea

²Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Kwangju 506-824, Korea

³Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-606, Korea

⁴Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-600, Korea

⁵Maize Experiment Station, Gangwon-do Provincial Agricultural Research and Extension Service, Gwangwon-do 200-150, Korea

ABSTRACT Immature embryos of 3 cultivars (Du Me Chal, Mi Baek Chal, Heug Jeom Chal) and 5 genotypes (HW1, KL103, HW3, HW4, KW7) were cultured on medium containing MS salts, Eriksson's vitamins, 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 25 mM proline, 100 mg/L casamino acid, 3 mM MES, 1.7 mg/L AgNO₃ and 20 g/L sucrose (SIM). Frequency of somatic embryo formation on explant of immature embryos showed in HW1 (45.20%), KL103 (5.75%), HW3 (37.20%), HW4 (30.10%), KW70 (55.20%), Mi Baek Chal (18.74%), Heug Jeom Chal (22.41%), Du Me Chal (36.72%) and Hi II type (< 10%), respectively. Yellowish friable embryogenic callus (YFEC) such as type II callus of Hi II genotype only produced from the HW3 and Heug Jeom Chal, whereas other cultivars and genotypes were directly formed somatic embryos with late-embryonic stages or expanded yellowish compact somatic embryo with morphological abnormality. The yellowish friable embryogenic callus (YFEC) could be proliferated on the same medium, which were maintained embryogenic capacity for 6 months over. Upon transfer to first regeneration and second regeneration medium, somatic embryos converted to plantlets at a frequency of approximately 100%. However, the expanded somatic embryos with abnormal morphology were slowly proliferated when subcultured on the same medium, and some of them were degenerated or converted to plantlets at a frequency of approximately 25%. Accordingly, The Heug Jeom Chal and HW3 genotype will be further used for development of high frequency transformation system in domestic maize germplasm.

Key words: Genotype, maize, somatic embryogenesis, type II callus, yellowish friable callus (YFEC), *Zey may L.*

서 론

옥수수는 세계 곡류생산량에서 벼와 밀 다음으로 많이

재배되는 중요한 작물이다. 분자유종을 통한 옥수수 신품종 개발을 위해서 기내 세포 및 조직 배양기술과 particle bombardment법 또는 *Agrobacterium*법을 통한 고효율 형질전환방법이 개발되어 오고 있다. Green과 Phillips (1975)가 옥수수 조직배양을 통해 식물체 재생에 관한 연구를

*Corresponding author Tel 82-62-970-0161 Fax 82-62-970-0165

E-mail: cps6546@nambu.ac.kr

처음으로 보고한 후, 배양재료로서 미숙배가 가장 적합한 것으로 알려져 왔다 (Armstrong and Green 1985; Hodges et al. 1986). 또한 식물체 재생과정에서 품종, 배양재료, 배지, 배양과정 등 여러 가지 요인에 의해 그 효율이 다를 수 있으며 (Phillips et al. 1988; Armstrong 1994), 가장 중요한 요인으로는 미숙배의 발달 단계와 배지 성분이라고 하였다 (Green and Phillips 1975; Finer and Nagasawa 1988).

옥수수 미숙배 배양으로부터 발생하는 배발생 캘러스의 형태는 품종과 계통에 따라 단단하고 느리게 성장하는 type I과 부드럽고 분열능이 높은 type II로 구별된다 (Armstrong and green 1985; Wan et al. 1995; Fromm et al. 1990; Walters et al. 1992; Dennehey et al. 1994; Zhang et al. 1996; Pareddy et al. 1997). Type I 캘러스를 particle bombardment법이나 *Agrobacterium* 공동배양법으로 형질전환할 경우 계대배양에 의해 증식이 쉽지 않기 때문에 선발과정에서 얻은 재분화 개체가 chimeric 또는 nontransgenic일 가능성이 높은 것으로 알려져 있다 (Wan et al. 1995; Bretschneider et al. 1997). 반면 type II캘러스는 부드러운 캘러스로서 생장이 빠르고 계대배양을 통해 1년이상 유지될 뿐 아니라 배발생능이 유지되기 때문에 선발과정에서 도입유전자의 "escape" 현상을 최소화 할 수 있고, 특히 fertile형질전환체를 대량으로 생산할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Fromm 1994). 이러한 type II캘러스는 A188과 B73품종의 교배로부터 얻어진 Hi II의 미숙배 배양으로부터 가장 효과적으로 얻을 수 있어 (Armstrong et al. 1991), 현재 옥수수 형질전환을 위한 모델 유전자원으로 이용되고 있다 (Frame et al. 2000).

따라서 본 연구에서는 국내 옥수수 품종의 체세포배 발생능 및 형질전환을 위한 최적 계통 선발을 위해서 3개 품종과 5개 계통을 대상으로 Hi II의 type II캘러스와 가장 유사한 노란색의 부드러운 배발생 캘러스 (yellowish friable embryogenic callus, YFEC)를 형성하는 계통을 스크리닝하였기에 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

국내 주요 재배 품종 (흑점찰, 두메찰, 미백찰)과 계통 (HW1, KL103, HW3, HW4, KW7) 등 8개 종자를 강원도 옥수수 시험장으로부터 분양 받았다. 모든 옥수수 종자를 1일 동안 암상태에서 증류수에 침적한 후 거어즈 처리하여 발아 시켰으며, 1 cm정도 유근이 자랐을 때 토양에 파종하여 성숙한 개체로 생육 시켰다. 성숙한 식물에서 발달된 이삭에 화분가루를 묻혀 수정한 후 약 10~11일째에 1.5~2.0 mm 크기의 미숙배를 얻어 무균적으로 분리한 후 배양

재료로 이용하였다.

배발생 캘러스 유도 및 재분화능 조사

미숙배의 크기가 1.5~2.0 mm로 자란 이삭을 취하여 70% 알코올로 2회 표면 살균한 후 무균작업대에서 미숙배를 분리하였다. 배발생 캘러스 유도배지는 MS salt (Murashige and Skoog 1962), Eriksson's vitamins, 1 mg/L 2,4-D, 25 mM proline, 100 mg/L casamino acid, 3 mM MES, 1.7 mg/L AgNO₃ 및 20 g/L sucrose를 조합하여 배지 (SIM)를 조성하였다. 배지는 7 g/L purified Agar를 첨가하기 전 pH를 5.8로 조정하여 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균 후 90×15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 ml씩 분주하여 사용하였으며, 페트리디쉬당 10개의 미숙배를 치상하였다. 치상 후 5일째 미숙배로부터 발달된 유경과 유근 부위를 제거한 나머지 절편을 동일배지에 옮겨 5주간 암배양하였다. 배양 5주째 절편으로부터 형성된 캘러스 형태 (type I, type II) 및 배발생 캘러스 형성 빈도를 조사하였고, 이후 절편으로부터 분리한 배발생 캘러스를 동일배지상에서 증식시켰다. 배발생 캘러스의 재분화 능을 조사하기 위하여 1차 재분화 배지 (MS salts, 0.1 mg/L 2,4-D, 10⁻⁷M ABA, 2% sucrose, 0.35% phytagar)와 2차 재분화배지 (N6 salts, Eriksson's vitamins, 6% sucrose, 0.7% phytagar)에 2주 간격으로 옮기면서 광도 46 μmol m⁻²s⁻¹의 16시간 광주기에서 배양한 후 식물체 전환 빈도를 조사하였다. 모든 국내 품종 및 계통에서 형성된 캘러스를 type II캘러스와 비교하기 위하여 모델 품종인 Hi II를 동일한 방법으로 수행하였으며, 모든 실험은 각 품종 및 계통 당 1회 약 90~100 개씩 3회 실시 하였다.

결과 및 고찰

옥수수의 고빈도 형질전환을 위해서는 type II캘러스와 유사한 배발생 캘러스 유도가 필수적이고 이를 위해서는 계통간 배발생캘러스 형성 및 식물체 재분화능에 대한 스크리닝 연구가 선행 되어져야 한다 (Armstrong and Phillips 1985). Type II캘러스를 형성하는 모델 품종인 Hi II와 국내 옥수수 재배 품종 (흑점찰, 미백찰, 두메찰) 및 계통 (HW1, KL103, HW3, HW4, KW7)을 각각 수정한 후 10~11일째에 1.5~2.0 mm 크기의 미숙배를 얻을 수 있었다. 미숙배 배양 후 5일째 배로부터 발달된 유경과 유근 부위를 제거하고 남은 절편을 다시 동일배지에 옮겨 5주동안 암배양 하였다. 배양 2주째부터 유경과 유근부위를 잘라낸 배양 절편 절단 부위로부터 캘러스 형성 또는 팽창되기 시작하였으며, 배양 3주째에 배 발생 캘러스의 증식이 일어나거나, 비정상 모양의 팽창된 체세포배가 직접 형성되어 품종

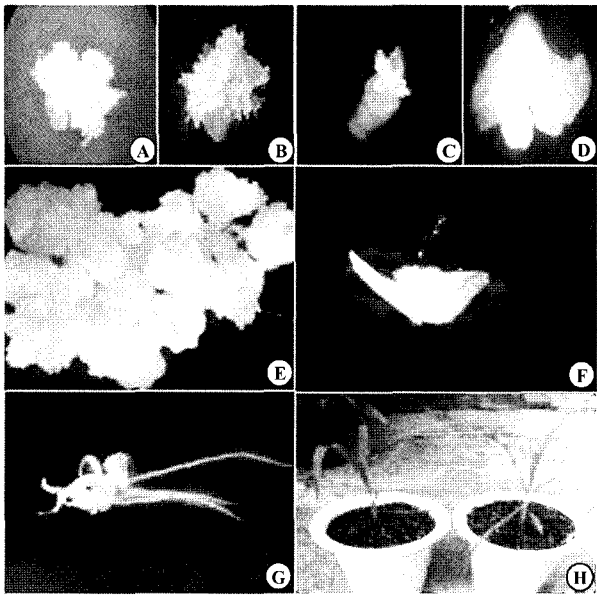


Figure 1. Morphological characteristics and plant regeneration of embryogenic callus and somatic embryos produced from immature embryo cultures of domestic maize cultivars and genotypes on MS medium (SIM). A: Type II callus of Hi II genotype, B: Yellowish friable embryogenic callus (YFEC) of HW3 genotype, C: Expanded somatic embryos with abnormal morphology of HW1 genotype, D: Somatic embryos directly formed from explant of immature embryo of KL103 genotype. E: Somatic embryo developed after transfer to first generation medium, F: Germination of somatic embryos on second regeneration medium, H: Mature plants transplanted to soil.

간 또는 계통 간 다양한 반응을 보이기 시작 하였다. 배양 5주 후 품종과 계통 간 배발생캘러스의 형태를 조사한 결과

HW1과 HW4계통에서는 배양 절편으로부터 캘러스 형성이나 체세포배 형성 없이 절편의 일부가 팽창되는 현상이 관찰 되었고, KL103, KW7, 미백찰, 두메찰 등에서는 자엽 절편의 절단부위에서 배발생 캘러스 형성을 거치지 않고 직접 late embryo단계의 체세포배가 유도 되는 현상이 각각 관찰 되었다. 반면 HW3계통과 흑점찰 품종에서는 절편 절단 부위로부터 배양 2주째부터 캘러스가 형성되기 시작하여 부드럽고 빠른 성장능을 갖는 연노란색의 배발생 캘러스 (yellowish friable embryogenic callus, YFEC) 관찰 되었다 (Figure 1, Table 1). 또한 모델 품종인 Hi II에서 형성된 배발생 캘러스의 경우 전형적인 type II캘러스로서 부드럽고 빠르게 증식 되었으며, 높은 배발생능을 갖는 것으로 관찰 되었다 (Figure 1). 식물의 품종과 계통에 따라 배발생 캘러스의 형태 및 식물체 재분화 능이 다를 수 있다 (Choi et al. 2002; Komatsuda 1992). 특히 옥수수의 경우 계통에 따라 단단하고 생장이 느린 배발생 캘러스를 형성하거나 (type I), 부드럽고 생장이 빠른 배발생캘러스 (type II)를 형성하기도 한다 (Armstrong and green 1985; Wan et al. 1995; Fromm et al. 1990; Walters et al. 1992; Denehey et al. 1994; Zhang et al. 1996; Pareddy et al. 1997). 본 연구에서 스크리닝한 국내 옥수수 품종 및 계통 중에서 캘러스 형성 없이 팽창되거나 (HW1, HW4), late embryo단계의 체세포배를 형성하는 경우 (KL103, KW7, 미백찰, 두메찰) 계대배양시 증식 속도가 느리고 단단한 특징을 갖는 것으로 보아 type I과 유사 하였으며, HW3와 흑점찰에서 형성된 부드럽고 계대배양시 증식속도가 빠른 배발생 캘러스 (yellowish friable embryogenic callus, YFEC)는 Hi II에

Table 1. Frequency of somatic embryogenesis and characteristics of embryogenic callus from the immature embryo cultures of domestic maize germplasm

Cultivars or genotypes		No. of immature embryos cultured	Somatic embryogenesis (% ± SE)	Morphological characteristics of embryogenic callus and somatic embryo
Genotypes	Hi II	300	10.00 ± 2.17	Yellowish friable embryogenic callus Fast growth
	HW1	297	45.20 ± 3.45	Somatic embryo expanded with? abnormal morphology Slow growth
	KL103	276	5.75 ± 0.72	Yellowish compact embryogenic callus and somatic embryo Slow growth
	HW3	288	37.20 ± 2.87	Yellowish friable embryogenic callus Fast growth
	HW4	295	30.10 ± 5.12	Somatic embryo expanded with abnormal morphology Slow growth
	KW7	317	55.20 ± 3.66	Yellowish compact embryogenic callus and somatic embryo Slow growth
Cultivars	Du Me Chal	270	36.72 ± 2.83	Yellowish compact embryogenic callus and somatic embryo Slow growth
	Mi Baek Chal	323	18.74 ± 3.15	Yellowish compact embryogenic callus or somatic embryo Slow growth
	Heug Jeom Chal	300	22.41 ± 1.53	Yellowish friable embryogenic callus Fast growth

서 형성된 type II 캘러스와 가장 유사하였다.

또한 품종 및 계통 간 체세포배 형성률을 조사한 결과 HW1 (45.20%), KL103 (5.75%), HW3 (37.20%), HW4 (30.10%), KW7 (55.20%)로 계통 중 KW7가 가장 높은 빈도를 보였으며, 품종에서는 미백찰 (18.74%), 흑점찰 (22.41%) 및 두메찰 (36.72%)로 두메찰의 경우가 높게 나타났다 (Table 1). 또한 각 품종과 계통에서 형성된 체세포배 또는 배발생 캘러스를 1차 재분화 배지와 2차 재분화 배지에 2주 간격으로 연속적으로 옮겨올 때 HW1과 HW4계통에서 형성된 비정상 형태의 팽창된 체세포배 중 약 25% 정도가 정상 식물체로 발달 하거나 발달하지 못한 체세포배의 경우 점차 괴사 되었다. 반면 다른 품종 및 계통의 체세포배 또는 배발생 캘러스 (yellowish friable embryogenic callus, YFEC)의 경우는 100%의 높은 식물체 재분화 빈도를 나타내었다. 계통간 또는 품종간 체세포배 발생능 차이는 옥수수 뿐 아니라 대두, 벼, 보리 및 밀 등에서 이미 보고된 바 있으며 (Green 1982; Foroughi-Wehr and Friedt 1981; Luhrs and Lorz 1987; Vasil et al. 1990), 특히 옥수수 여러 계통의 스크리닝 연구를 통해 선발된 A188계통은 식물체 재분화 빈도가 높은 것으로 알려져 있고, 이러한 높은 재분화능 때문에 이후 세포배양 및 원형질체 배양을 통한 식물체 재생 연구와 electroporation 또는 particle bombardment 법에 의한 외래 유용 유전자 도입을 위한 형질전환 연구에서 중요한 유전자원으로 이용되어 오고 있다 (Rhodes et al. 1988; Bronsema et al. 1997). 따라서 옥수수를 포함한 많은 식물에서 동일 종이라 할 지라도 계통 간 또는 품종간 체세포배 발생능이나 식물체 재분화능에 있어서 현저한 차이가 있기 때문에 광범위한 스크리닝 연구를 통해서 우수한 품종이나 계통 선발과정이 필수적이라 할 수 있다.

본 연구로부터 얻은 국내 옥수수 품종 및 계통의 노란색의 부드러운 배발생 캘러스 (YFEC) 형태 및 체세포배 발생 빈도에 대한 결과로 볼 때 HW3과 흑점찰이 HW1과 KW7에 비해서 체세포배의 발생빈도는 낮을 지라도 Hi II 품종과 가장 유사한 type II 캘러스를 형성하고 높은 식물체 재분화 전환율을 나타내기 때문에 국내 옥수수 형질전환 연구에서 중요한 유전자원으로 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

적 요

국내 옥수수 3품종 (두메찰, 미백찰, 흑점찰)과 5 계통 (HW1, KL103, HW3, HW4, KW7)의 미숙배를 1 mg/L 2,4-D, 25 mM proline, 100 mg/L casamino acid, 3 mM MES, 1.7 mg/L AgNO₃, Eriksson's vitamin 및 20 g/L sucrose가 첨가된 MS배지 (SEM)에 5주 동안 배양하였다. 각 계통 및 품종의 체세포배 발생 빈도는 HW1 (45.20%), KL103 (5.75%), HW3 (37.20%), HW4 (30.10%), KW70

(55.20%), 미백찰 (18.74%), 흑점찰 (22.41%), 두메찰 (36.72%)이었으며, 모델 품종인 Hi II type에서는 10% 이하였다. Hi II계통에서 형성되는 type II캘러스와 같은 노란색의 부드러운 배발생캘러스 (yellowish friable embryogenic callus, YFEC)는 오직 HW3와 흑점찰 품종에서 형성되었으며, 반면 다른 품종 및 계통에서는 late-embryo단계의 단단한 체세포배가 직접 발생되거나 형태적으로 비정상 모양을 갖는 단단하고 팽창된 체세포배가 발생 되었다. 노란색의 부드러운 배발생캘러스 (yellowish friable embryogenic callus, YFEC)는 동일배지에서 빠르게 증식되었고 6개월 이상 배발생 능이 유지 되었으며, 1차 재분화 배지와 2차 재분화 배지에 옮겨올 때 모두 식물체로 전환 되었다. 그러나 단단한 노란색의 배발생캘러스와 비정상 형태의 체세포배는 동일배지에서 매우 느리게 증식되었고, 재분화 배지에서 낮은 식물체 전환율 (25%)을 보였다. 따라서 본 연구로부터 선발된 HW3와 흑점찰은 향후 국내 옥수수 유전자원을 이용한 형질전환 시스템 개발연구에 이용 될 수 있을 것으로 예상된다.

사 사

본 연구는 바이오그린21사업단 (Biogreen21)과 작물유전체사업단 (Crop Functional Genomics)의 지원하에 수행 되었으며, Hi II계통 종자는 네브라스카 대학 Tom Clemente 박사로부터 공급받아 수행하였다.

인용문헌

- 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
- Armstrong CL (1994) Regeneration of plants from somatic cell culture: Applications for in vitro genetic manipulation. In: Freeling M, Walbot V(eds), *The maize handbook*, Springer-Verlag, New York, pp 663-671
- Brettschneider R, Becker D, Lorz H (1997) Efficient transformation of scuteller tissue of immature maize embryos. *Theor Appl Genet* 94: 737-748
- Bronsema FBF, van Oostveen WJF, van Lammeren AAM (1997) Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature embryos of the inbred lines A188 and A632. *Plant cell Tiss Org Cult* 50: 57-65
- Choi PS, Komatsuda T, Kim MH, Choi KM, Choi DW, Liu JR (2002) Screening of soybean recombinant inbred lines

- for high competence somatic embryogenesis. Korean J Plant Biotechnol 29: 135-138
- Dennehey BK, Petersen WL, Ford-Santino C, Pajeau M, Armstrong CL (1994) Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene bar in maize transformation. Plant Cell Tiss Org Cult 36: 1-7
- Foroughi-Wehr B, Friedt W (1981) Responsiveness to anther culture of *Hordeum vulgare* cv. "Dissa" and its parents. Barley Genet Newsl 11: 50-53
- Frame BR, Zhang H, Cocciolone SM, Sidorenko LV, Dietrich CR, Pegg SE, Zhen S, Schnable PS, Wang K (2000) Production of transgenic maize from bombarded type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 36: 21-29
- Fromm ME (1994) Production of transgenic maize plants by microprojectile-mediated gene transfer. In: Freeling M, Walbot V(eds), The maize handbook, Springer-Verlag, New York pp 677-684
- Fromm ME, Morrish F, Armstrong CL, William R, Thomas J, Klein T (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. Bio/Technology 8: 833-839
- Finer JJ, Nagasawa A (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). Plant Cell Tiss Org Cult 15: 125-136
- Green CE (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*. In: Fujiwara A (ed), Plant Tissue Culture, Tokyo, pp 107-108
- Green CE, Phillips RL (1975) Plant regeneration from tissue culture of maize. Crop Sci 15: 417-421
- Hodges TK, Kamo KK, Imbrie CW, Beckwar MR (1986) Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. Biotechnology 4: 219-223
- Komatsuda T 1992 Research on somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean. Natl Inst Agrobiol Resources (Japan), Ann Rep 7: 1-78
- Luhrs R, Lorz H (1987) Plant regeneration in vitro from embryogenic cultures of spring-and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. Theor Appl Genet 75: 16-25
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Pareddy D, Petolino J, Skokut T, Hopkins N, Miller M, Welter M, Smith K, Clayton D, Pescitelli S, Gould A (1997) Maize transformation via helium blasting. Maydica 42: 143-154
- Phillips RL, Somers DA, Hibbered KA (1988) Cell/tissue culture and in vitro manipulation. In: Sprague GF, Dudley JW (eds), Corn and corn improvement, Springer-Verlag, New York , pp 345-387
- Rhodes CA, Pierce DA, Mettler IJ, Mascarenhas D, Detmer JJ (1988) Genetically transformed maize plants from protoplasts. Science 240: 204-207
- Vasil IK, Vasil V, Redway F (1990) Plant regeneration from embryogenic calli, cell suspension cultures and protoplasts of *Triticum aestivum* L. (wheat). In: Nijkamp HJJ, Vander Plas LHW, Van Aartrijk J (eds), Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Proceeding of the VIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp 33-37
- Walters DA, Vetsch CS, Potts DE, Lundquist RC (1992) Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. Plant Mol Biol 18: 189-200
- Wan Y, Widholm JM, Lemaux PG (1995) Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea may* L.). Planta 196: 7-14
- Zhang S, Warkentin D, Sun B, Zhong H, Sticklen M (1996) Variation in the inheritance of expression among sub-clones from unselected (*uidA*) and selected (*bar*) transgenes in maize (*Zea may* L.). Theor Appl Genet 92: 742-761

(접수일자 2005년 3월 14일, 수리일자 2005년 4월 1일)