*Agrobacterium*을 이용한 제초제 저항성 옥수수 형질전환체 생산

홍준기¹ · 이강섭¹ · 박기진² · 김주곤³ · 장희정¹ · 서은정¹ · 김경환¹ · 이연희^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, ²강원도농업기술원, ³서울대학교 그린바이오과학기술연구원 종자생명과학연구소

Production of Transgenic Maize Plants with Herbicide Resistance Through *Agrobacterium*-mediated Transformation

Joon Ki Hong¹, Gang-Seob Lee¹, Ki Jin Park², Ju-Kon Kim³, Hee Jeung Jang¹, Eun Jung Suh¹, Kyung-Hwan Kim¹, and Yeon-Hee Lee^{1*}

¹Agricultural Biotechnology Department, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, 370 Nongsaengmyeong-ro, Jeonju 54874, Republic of Korea

²Gangwondo Agricultural Research and Extension Services, Chuncheon 24226, Republic of Korea

³Graduate School of International Agricultural Technology and Crop Biotechnology Institute/GreenBio Science & Technology, Seoul National University, Pyeongchang 25354, Republic of Korea

Abstract Maize is the most important grain crop in the world. Genetic engineering technology has been used to enhance its various agronomical traits. The transformation of maize is a crucial step in the application of gene technologies to improve maize. The choice of genotype and explant material influences the transformation efficiency and the production of stable transgenic plants. Immature embryos of Hi IIA were infected with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 including superbinary vectors (*bar* and *GUS* or *GFP* genes). The transformation efficiency was based on transgenic calli induction from immature embryos on the selection medium with 3 mg/L bialaphos. The transformation efficiency varied from 1.01 to 2.74%. The integration and expression of *bar*, *GUS*, and *GFP* genes were confirmed in T₀ and T₁ generations of transgenic plants using genomic PCR and the bar strip test. In addition, herbicide resistance in T₁ transgenic plants was observed when leaves and whole plants were treated with Basta. These results suggest that the successful *Agrobacterium*-mediated transformation of Hi IIA will improve further opportunities for functional genomic and genome editing studies in maize.

Keywords Genotype, Herbicide resistance, Immature embryo, Maize, Transformation

Received on July 9, 2019. Revised on July 29, 2019. Accepted on September 17, 2019.

* Corresponding Author (E-mail: yhl2222@korea.kr, Tel: +82-63-238-4690, Fax: +82-63-238-4654)

서 언

옥수수는 식용, 사료, 에너지, 산업소재, 제약 원료 등 여러 분야에 사용되는 세계 주요 작물 중 하나이다(Cho et al. 2014). 또한 옥수수는 유전학, 유전체학, 분자생물학 연구를 위한 중요한 단자엽 모델 작물이기도 하다(Que et al. 2014). 최근까지 옥수수 형질개량을 위해 생명공학 기술을 적용하여 해충저항성 및 제초제 저항성 GM 옥수수가 개발되어 세계적으로 공급되고 있다(Cho et al. 2014, Que et al. 2014). 또한 최근에는 기후변화에 대응하기 위해서 생물학적, 비생물학적 스트레스에 내성을 갖는 옥수수 품종 개발, 우성불임 옥수수 개발 등에 유전자 편집기술이 활용되고 있다(Xing et al. 2014, Svitashv et al. 2016).

옥수수에 생명공학 기술을 적용하여 새로운 형질을 갖는 신종 개발 연구는 재분화 및 *Agrobacterium* 감염에 의한 옥수수의 저항성 때문에 극히 제한적이었다. 따라서 옥수수 형질전환체는 높은 재분화능력의 유전적 형질을 가진 옥수수 품종으로부터 분리된 미성숙 배, 원형질체, 배상체 캘러스 등을 유도하여 유전자총(particle bombardment), *Agrobacterium* 공동배양법, polyethyleneglycol (PEG) 매개법 등을 이용하여 개발되어 왔다(Gordon-Kamm et al. 1990, Ishida et al. 1996, Songstad et al. 1996, Wang et al. 2000, Frame et al. 2002, Sidorov et al. 2006). 이러한 다양한 옥수수 형질전환방법 중에서 *Agrobacterium*과 식물 조직과의 공동배양법을 이용한 형질전환 방법은 낮은 copy 수의 유전자 도입 및 외래 유전자의 핵내 염색체로 안정적인 삽입 등의 장점을

가지고 있어서 가장 많이 이용되고 있다(Hamilton et al. 1996, Ishida et al. 1996, Zhao et al. 1998, Cho et al. 2005, Liang et al. 2014, Que et al. 2014). 옥수수에서 *Agrobacterium* 공동배양법을 이용한 안정적인 형질전환 효율 증대를 위해서 옥수수 genotype 선별, 최적의 운반체 제작, *Agrobacterium* 균주 선정, 공동배양 배지 및 조건, 형질전환된 Type II 캘러스의 선별 및 높은 재분화능 조건 탐색 등에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다(Hamilton et al. 1996, Ishida et al. 1996, Zhao et al. 1998, Lee et al. 2007, Cho et al. 2014, 2015, Que et al. 2014). 현재 미국 아이오와, 미조리 대학 등 외국의 경우 식물 형질전환센터를 설립하여 구축된 옥수수 형질전환 시스템을 활용하여 형질전환이 잘되는 Hi II 계통을 위주로 형질전환체를 제작하여 전 세계 연구자에게 제공하고 있으며 유전자 편집기술에 활용되고 있다(Frame et al. 2006, Lee & Zhang 2016). 국내 옥수수 형질전환 연구로는 외래 유전자를 Hi II 계통의 미성숙 배나 Type II 캘러스에 도입하여 제초제 저항성과 백신 생산 형질전환체를 개발한 연구가 보고되었다(Cho et al. 2005, Kim et al. 2009, Kim et al. 2014). 최근에 들어 국내 생명공학 연구 결과로 생산된 개발 유전자의 해외 글로벌화, 수입대체 및 통일 대비를 위한 신종 개발 필요성, 유전자 변형 작물을 대체할 수 있는 유전자 편집 기술 적용을 위해서 형질전환 효율이 높고 재현성이 우수한 옥수수 형질전환 시스템 구축의 중요성이 대두되고 있다.

따라서 본 논문에서는 Hi IIA 옥수수 계통의 미성숙 배와 *Agrobacterium*과의 공동배양으로 형질전환체를 획득하여 후대 검정을 통하여 도입 유전자의 안정적 유전과 발현을 확인하여 옥수수 형질전환 시스템을 확립하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

옥수수 품종 Hi IIA는 미국 USDA (United States Department of Agriculture)로부터 분양 받아 사용하였다. 옥수수 종자는 물에 잠길 정도로 침지하여 28°C에서 발아시켰다. 발아 후 4일 때 50공 포트에 옮겨 심은 후 잎의 길이가 15-20 cm가 되면 포장으로 이식하여 재배하였다. 최적의 미성숙 배는 수분 후 9-15일 이내에 1.5-2.0 mm 크기일 때 무균 상태로 추출하여 형질전환에 사용하였다(Hong et al. 2017a).

식물 형질전환 벡터 제작 및 *Agrobacterium* 배양

옥수수 형질전환을 위해서 superbinary pSB1 벡터에 리포터

유전자 *GUS*와 *GFP*를 옥수수 *ubiquitin* 프로모터(UbiPro)와 octopine synthase terminator (*ocs-ter*) 사이에 융합하였으며 제초제 Phosphinothricin (ppt) 분해 유전자 Phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT 또는 *bar*-Bialaphos resistance) 부위를 포함하는 옥수수 형질전환용 벡터를 제작하였다. 또한 단자엽에 발현이 최적화되도록 염기서열 코돈을 변형한 *mPAT*을 4 x CaMV 35S 프로모터와 nopaline synthase 터미널(*nos-ter*)사이에 융합하여 옥수수 형질전환용 벡터를 제작하였다. 제작된 벡터들은 tri-parental mating 방법으로 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입하였으며 유전자 도입이 확인된 콜로니를 옥수수 형질전환에 사용하였다.

옥수수 형질전환은 Ishida et al. (2007)과 Lee & Zhang (2016)의 방법을 기본으로 하여 배지 조성을 일부 수정하여 사용하였다. 형질전환 벡터를 포함하는 *Agrobacterium*을 50 mg/L spectinomycin이 포함된 YEP agar 배지에 도말 하여 28°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 균은 AB배지에 도말 하여 20°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 균을 접종배지(N6 salts and vitamins, 1 g/L casamino and vitamin assay, 1.5 mg/L dicamba, 0.5 mg/L 2,4-D, 68.4 g/L sucrose, 36 g/L glucose, 100 µM acetosyringone, and pH 5.2) 5 ml로 OD600에서 1.0이 되게 조정 후 24°C에서 100 rpm으로 4시간 배양하여 접종액으로 사용하였다.

형질전환체 제작 및 세대 육성

추출된 1.5-2.0 mm 크기의 최적 미성숙 배는 준비된 제작된 벡터를 포함하는 *Agrobacterium*접종액에 5분간 담가두었다. 접종된 미성숙 배는 공동 배양 배지(N6 salts, N6 vitamins, 1.22 mg/L CuSO₄, 0.7 mg/L L-proline, 0.5 mg/L MES, 30 g/L sucrose, 10 g/L glucose, 1.5 mg/L dicamba, 0.5 mg/L 2,4-D, 300 mg/L L-cysteine, 1 mM DTT, 0.85 mg/L AgNO₃, 100 µM acetosyringone, 3 g/L Gelrite, pH 5.8)에 scutellum 조직이 위쪽으로 하고 배측이 배지에 닿도록 치상하여 21°C에서 3일간 공동 배양하였다. 공동 배양 후 감염시킨 미성숙 배는 resting 배지(N6 salts, N6 vitamins, 0.7 mg/L L-proline, 0.5 mg/L MES, 30 g/L sucrose, 1.5 mg/L dicamba, 0.5 mg/L 2,4-D, 0.85 mg/L AgNO₃, 150 mg/L timentin, 3 g/L Gelrite, pH 5.8)로 옮겨 28°C에서 7일간 암 배양하였다.

배양 후 미성숙 배를 첫 번째 선발배지(SM1: N6 salts, N6 vitamins, 0.7 mg/L L-proline, 0.5 mg/L MES, 30 g/L sucrose, 1.5 mg/L dicamba, 0.5 mg/L 2,4-D, 1.5 mg/L bialaphos, 0.85 mg/L AgNO₃, 150 mg/L timentin, 3 g/L Gelrite, pH 5.8)로 옮긴 후 25°C에서 2주 동안 암 배양하였다. 발생한 캘러스를 두 번째

선발배지(SM2: N6 salts, N6 vitamins, 0.7 mg/L L-proline, 0.5 mg/L MES, 30 g/L sucrose, 1.5 mg/L dicamba, 0.5 mg/L 2,4-D, 3.0 mg/L bialaphos, 0.85 mg/L AgNO₃, 150 mg/L timentin, 3 g/L Gelrite, pH 5.8)로 옮긴 후 28°C, 암 조건에서 2주 간격으로 3회 계대배양 하였다. 왕성하게 자라는 배발생 캘러스를 세 번째 선발배지(SM3: N6 salts, N6 vitamins, 0.7 mg/L L-proline, 0.5 mg/L MES, 30 g/L sucrose, 1.5 mg/L 2,4-D, 3.0 mg/L bialaphos, 0.85 mg/L AgNO₃, 150 mg/L timentin, 3 g/L Gelrite, pH 5.8)로 옮긴 후 28°C, 암 조건에서 2주 간격으로 2달 동안 계대배양 하면서 크고 빨리 자라는 캘러스는 분할하여 새로운 배지로 옮겨 주었다.

Type II 특성을 가진 배상체 캘러스를 성숙배지(MM: MS salts, MS vitamins, 60 g/L sucrose, 2.0 mg/L glycine, 3.0 mg/L bialaphos, 150 mg/L timentin, 3 g/L Gelrite, pH 5.6)로 옮긴 후 28°C, 암 조건에서 2-3주 배양하여 배가 성숙하게 하였다. 성숙된 배는 재분화(RM: 2.9 g/L MS salts, MS vitamins, 30 g/L sucrose, 2.0 mg/L glycine, 3 g/L Gelrite, pH 5.6) 배지로 옮기고 25°C, 16시간 광 조건에서 싹과 뿌리가 나올 때까지 배양하였다. 이 후 작은 식물체를 다시 새로운 재분화 배지로 옮겨 25°C, 16시간 광 조건에서 2주 배양하여 키운 다음 토양에 순화 한 후 온실에서 생육시키면서 자가수분을 통해 종자를 수확하였다.

형질전환체 PAT 발현 및 제초제 저항성 분석

형질전환체의 1차 선별을 위해 제초제 저항성 PAT 단백질(*bar* 유전자 발현)을 분석하였다. 4주 성장한 형질전환 옥수수 잎 100 mg에 멸균된 증류수 500 μ l을 넣고 분쇄하여 4°C에서 12000 rpm으로 1분간 원심분리한 후 상층액을 PAT 검사 스트립(AgraStrip LL strip test, ROMER, Austria)을 사용하여 분석하였다. 또한 형질전환체의 제초제 저항성을 분석하기 위하여 4주 성장한 T₁의 5번째 잎 일부에 0.3% Basta를 면봉으로 도포하거나 스프레이를 이용하여 형질전환체에 살포 한 후 10일 뒤에 생존 확인을 통해 제초제 저항성을 확인하였다(Cho et al. 2015).

형질전환 옥수수 유전자 도입 및 발현 분석

Genomic DNA PCR과 RT-PCR을 통해 옥수수 형질전환체에 서 유전자 삽입 유무와 발현을 각각 확인하였다. 옥수수 식물체 잎으로부터 genomic DNA를 CTAB extraction solution을 사용하여 분리하였다. 분리된 genomic DNA 250 ng을 사용하여 유전자 특이 프라이머 GUSF (5'-TCGTGCTGCGTTTCGATG-3'), GUSR (5'-GCATCACGCAGTTCAACG-3'), GFPF (5'-TG

AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC-3'), GFPR (5'-TTATT TGTATAGTTCATCCATGCC-3'), barF (5'-AGAAACCCAC GTCATGCC -3'), 및 barR (5'-TGCACCATCGTCAACCAC-3')를 이용하여 PCR (95°C에서 3분 1 사이클, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초, 30 사이클, 72°C 10분 1 사이클 조건)로 식물체내 유전자 도입을 확인하였다(Petrillo et al. 2008).

형질전환체에 도입된 유전자 발현을 확인하기 위해 3 주 동안 재배한 형질전환 식물체의 잎을 마쇄한 시료로부터 Hong et al. (2013) 방법과 유사하게 total RNA를 분리하였다. Semi-quantitative RT-PCR 분석을 위해 역전사 효소(MMLV transcriptase RNase free, Toyobo)를 이용하여 total RNA 5 μ g을 cDNA 라이브러리로 제작하고 3배 희석하여 2 μ l를 PCR 증폭에 사용하였다(Hong et al. 2017b). 유전자를 확인할 수 있는 유전자 특이 프라이머를 이용한 PCR (95°C에서 3분 1 사이클, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초, 30 사이클, 72°C 10분 1 사이클 조건)로 유전자 발현을 확인하였고 DNA 염기서열 분석을 통해 도입된 유전자의 발현을 확인하였다. RT-PCR 후 유전자 발현 수준 측정을 위한 정량적 대조군으로 *Actin* 유전자(*Actin* 유전자 특이 프라이머: ActinF 5'-ATTCAGGTGATGGTGTGAGCCACAC-3' 및 ActinR 5'-GCCACCGATCCAGACACTGTACTTCC-3')를 사용하였으며 모든 실험은 3 반복으로 수행하였다(Coelho et al. 2005).

GUS발현 분석

*Agrobacterium*과 공동 배양 후 미성숙 배, 제초제 저항성 선발 캘러스, 형질전환체 종자를 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuroide (X-gluc; Duchefa, Haarlem, The Netherlands)가 포함된 용액에(50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 0.1% Triton X-100, 2 mM X-gluc) 37°C 에서 침지 시켰다(Jefferson et al. 1987). 24시간 후 70% 에탄올로 탈색 시킨 후 GUS발현 양상을 분석하였다. 대조구는 *Agrobacterium*과 공동 배양하지 않은 옥수수의 미성숙 배, 캘러스, 종자를 사용하였다.

결과 및 고찰

옥수수에서 유용 유전자 도입 및 유전자 편집 등의 기술로 신제품 개발을 하기 위해서는 기본적으로 형질전환 시스템이 구축되어야 한다. 옥수수의 여러 조직으로부터 형질전환 연구가 시도되었으나 미성숙 배로부터 *Agrobacterium* 공동배양법이 옥수수 형질전환 효율을 안정적이고 높게 유도하는 것으로 알려

져 있다(Ishida et al. 2007, Cho et al. 2014, Liang et al. 2014, Que et al. 2014). 옥수수에서는 처음으로 *Agrobacterium* 공동배양법을 통해 A188 순계계통에서 미성숙 배를 이용하여 형질전환이 성공적으로 이루어졌으나 농업적 형질이 좋지 않아 형질전환 재료로 많이 활용되지 않고 있다(Ishida et al. 1996). 이후 A188과 B73 교배로부터 유래된 Hi II 계통의 미성숙 배에서 성공적으로 형질전환이 이루어졌으며 높은 재분화능과 후대종자 생산성 때문에 최근에도 옥수수 형질전환연구에서 많이 이용되는 유전자원이다(Zhao et al. 1998, Frame et al. 2002, Vega et al. 2008). 본 실험에서는 국외 품종인 Hi II 계열 재배 조건을 국내에서 확립하여 형질전환에 적합한 건전한 미성숙 배로부터 높은 재분화율을 확인한 기존의 연구결과를 바탕으로 포장에서 재배한 Hi II A로부터 미성숙 배를 분리하여 형질전환에 사용하였다(Hong et al. 2017a).

형질전환에 사용하기 위한 벡터는 옥수수 *Ubiquitin* 프로모터에 리포터 유전자 *GUS*와 *GFP*를 조합하였고 형질전환체 선발 마커로 제초제 저항성 *bar* 및 *mPAT*유전자를 사용하였다. *mPAT* 유전자는 형질전환 선발 효율을 높이기 위하여 단자엽 코돈으로 변형하여 직접 제작하여 사용하였다. 형질전환에 사용하기 위한 미성숙 배는 수분시킨 후 9-12일째 가장 높은 활성을 나타내는 1.5-2.0 mm 크기일 때 분리하였다. 분리한 미성숙 배를 벡터를 포함하는 *Agrobacterium*과 공동배양 후 resting배지에서 7일간 배양하였다(Fig. 1A). 이 기간 동안에 미성숙 배로부터 짧은 유근 부위가 나오는데 이를 제거한 미성숙 배를 Bialaphos 1.5 mg/L가 첨가된 1차 선발배지로 옮겨 2주 배양하였다. 배양 후 Bialaphos 3.0 mg/L가 첨가된 2차 선발배지에서 2주 간격으로 새로운 배지에 계대배양을 하면서 6주 정도 배양하였다. 약 6주째에 제초제에 저항성을 나타내는 캘러스를 새로운 3차 선발 배지로 옮겨 2주 동안 배양하면서 캘러스를 증식시켰다. 이러한 단계 동안에 크고 빠른 성장과 배 발생 능력을 가지는 Type II 캘러스가 증식되는데 약간 건조하고 부서지기 쉬운 상태의 어린 캘러스를 주로 선발하여 새로운 배지로 옮기는 것이 중요하다(Fig. 1B). 약 2달 배양 후 불투명한 배를 포함하는 있는 배 발생 캘러스를 성숙 배지로 옮겨 28℃, 암 상태에서 2-3주간 배양하였을 때 배가 성숙하여 뚜렷한 배 발생 현상이 관찰되었다(Fig. 1C). 아이보리색의 캘러스를 재분화 배지로 옮겨 25℃, 16시간 광 조건에서 싹과 뿌리가 나올 때까지 배양하였다(Fig. 1D, 1E). 작은 식물체는 순화 후 완전한 식물체로 재생시켰으며 토양에 순화 한 후 온실에서 생육시키면서 자가수분을 통해 종자를 수확하였다(Fig. 1F-1I). *Agrobacterium*이 감염된 미성숙 배로

부터 제초제 저항성이 있는 캘러스 형성 및 재분화 단계는 기존의 Hi II 계열에서 보고된 현상과 거의 동일한 결과를 나타내었다(Lee & Zhang 2016). 이렇게 재분화되어 나온 T₀식물체를 화분으로 이식 한 후 2주 생육한 형질전환 옥수수 잎에서 PAT 검사 스트립을 이용하여 도입된 *bar*유전자 발현을 확인한 결과 재분화되어 나온 모든 식물체에서 제초제 저항성을 나타내었다(Fig.

Fig. 1. Plant regeneration from immature embryo cultures in maize of Hi IIA genotype transformed with *Agrobacterium* carrying *GUS*, *GFP*, and *bar* genes. (A) Infected immature embryos. (B) Transgenic embryogenic type II callus formation on selection medium with 3 mg/L bialaphos. (C) Transgenic somatic embryos on maturation medium. (D) and (E) Germinated somatic embryos on regeneration medium. (F) Regenerated plantlets from somatic embryos on regeneration media. (G) Transgenic plantlet in small pots. (H) Transgenic plants in greenhouse. (I) Harvested ears from transgenic T₀ plants through artificial self-pollination.

2G-2I). 본 실험은 각각의 유전자 종류별로 3번의 실험을 진행하였으며 사용된 총 293개의 미성숙 배에서 6개의 미성숙 배로부터 bialaphos에 저항성을 나타내는 캘러스가 형성되었다. 형질전환 효율은 사용된 총 미성숙 배에서 저항성 캘러스를 형성한 미성숙 배 수의 비율을 기준으로 하였을 때 평균적으로 2%의 형질전환 효율을 나타내었다(Table 1). 형질전환 선발 효율을 높이기 위하여 사용된 *mPAT* 유전자에서 형질전환 효율이 2.74%로 가장 높게 나타나 향후 형질전환 효율 향상에 유용하게 사용될 것으로 사료된다. 또한 하나의 미성숙 배로부터 형성된 형질전환 캘러스에서 재분화 되어 나온 식물체 수는 2.5-18개로 상당히 많은 식물체를 얻을 수 있었다(data not shown). Kim et al.

(2009)의 보고에서 Hi II 미성숙 배 유래 Type II 캘러스에 *Agrobacterium*으로 형질전환을 한 경우 형질전환 효율은 0.6%로 상당히 낮았다. 따라서 효율적이고 성공적인 옥수수 형질전환을 위해서는 미성숙 배를 사용하는 것이 가장 바람직한 것으로 사료되며 국외에서도 대부분 미성숙 배를 사용하는 것으로 보고되고 있다.

선발 마커로 도입된 *bar* 유전자외에 *GUS*, *GFP* 유전자 도입을 genomic DNA PCR로 확인하였다(Fig. 2J-2K). *GUS* 유전자의 도입과 발현은 형질전환 단계별로 GUS염색을 통해 확인하였다(Fig. 2A-2F). 순화된 T₀ 형질전환체 68개의 식물체를 온실에서 재배한 결과 종자가 수확된 옥수수는 3개체로 4.4%의 낮은 수확

Fig. 2. Transgenic verification of regenerated T₀ plants of maize. (A) and (B) Transient expression in uninfected and infected immature embryo, respectively. (C) and (D) GUS expression in callus of untransformant and transformant, respectively. (E) and (F) GUS expression in seeds of untransformant and transformant, respectively. (G), (H), and (I) The expression of phosphinothricin acetyltransferase in T₀ *GUS-bar*, *GFP-bar*, and *mPAT* transgenic maize plants using PAT test strip, respectively. (J) and (K) The verification of *GUS*, *GFP*, and *bar* gene in transgenic plants through genomic PCR analysis. Lanes: M, molecular size marker; PC, positive control; Wt, non-transgenic wild-type; lanes 1-14 and 1-7, selected transgenic lines, respectively.

Table 1. Summary of transformation experiments of maize inbred Hi IIA.

Gene	No. of embryo infected (A)	No. of embryo with Bialaphos resistant callus (B)	No. of regenerated T ₀ plants	Transformation efficiency (B/A × 100, %)	No. of lines with seeds
<i>GUS (bar)</i>	121	3	56	2.48	2
<i>GFP (bar)</i>	99	1	7	1.01	1
<i>mPAT</i>	73	2	5	2.74	nh ^z
Total	293	6	68	2.05	3

^znh, not harvested

를 보였다(Table 1, Fig. 1I). 이러한 현상은 6-7월에 시작된 형질전환 진행과정 중 최종단계인 형질전환체를 확보하여 생육하는 시기가 옥수수 생육에 적합하지 않은 겨울철과 맞물려 종자 형성이 잘 되지 않은 것으로 예측되었다. 또한 생육 형태가 비정상적인 형질전환 개체들도 일부 존재하여 종자 수확이 어려웠다. 따라서 날씨와 계절에 영향을 받지 않고 옥수수를 생장·생육 할 수 있는 최적의 환경도 함께 구축되어야 할 것으로 여겨진다. *mPAT* 유전자가 도입된 식물체는 순화 10일 후 앞에서 PAT 스트립 검정에서 양성 반응을 통해 형질전환체로 확인 되었으나 화분으로 이식 후 생육불량으로 후대를 확보 할 수 없었다. 3 개체의 형질전환체로부터 수확된 종자는 후대 검정을 위해 이듬해 봄에 온실에서 재배하여 T₁ 식물체에서 후대 검정 분석에 사용하였다. 형질전환체로부터 수확한 종자를 옥수수 생육시기에 맞춰 파종하여 4주 생장시킨 후 앞에서 PAT 검사 스트립을 이용하여 양성 반응을 나타내는 T₁ 식물체를 선발하였다(Fig. 3A, 3B). 선발된 T₁ 식물체 잎과 식물체 전체에 0.3% Basta 제초제를 도포 후 10일 뒤에 비형질전환체와 비교 분석한 결과, 형질전환체는 모두 생존하여 제초제 저항성을 나타내는 것을 확인 하였다(Fig. 3C). 제초제 저항성을 나타내는 형질전환체 잎으로부터 genomic DNA PCR과 RT-PCR 분석을 통해 *GUS*, *GFP*, *bar* 유전자 도입을 확인 할 수 있었고 안정적인 도입 유전자의 발현을 확인 할 수 있었다(Fig. 3D, 3E). 따라서 Hi IIA 미성숙 배에 *Agrobacterium* 공동배양법으로 외래 유전자가 옥수수 염색체에 삽입된 후 다음 세대에 안정적으로 유전되고 있음을 확인 할 수 있었다.

국외에서는 *Agrobacterium* 공동배양법으로 옥수수 A188과 Hi II 및 다른 유전형질을 가지는 계통의 미성숙배에서 각각 5-30%, 5.5%, 2-11%의 높은 형질전환효율의 시스템이 확립되어 유전자 기능 연구, GM 옥수수 생산이 이루어졌고 최근에 들어서는 유전자 편집 기술 등에 활용하고 있다(Ishida et al. 1996, Frame et al. 2002, Que et al. 2014, Char et al. 2017). 본 연구에서도 형질전환 효율이 높은 Type II 캘러스를 발생하는 Hi IIA 미성숙 배에 *Agrobacterium* 공동배양법을 이용하여 옥수수 형질전환체를 생산 할 수 있었고, 제초제 저항성 *bar* 유전자를 사용하여 형질전환체를 선발할 수 있음을 확인하였다. 그러나 본 연구에서는 형질전환 효율이 2% 정도로 다소 낮으므로 향후 형질전환 효율을 높이기 위한 최적의 미성숙 배 확보 조건, *Agrobacterium* 균주 선정 등에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 국외의 경우 형질전환이 어려운 유전자형을 지닌 옥수수 엘리트 계통의 형질전환 효율을 높이기 위하여 형태

형성 관련 *BABY BOOM*과 *WUSCHEL* 유전자를 목표 유전자와 동시에 도입하여 형질전환체를 높은 효율로 생산하는 연구가 보고되었다(Mookkan et al. 2017). 따라서 이러한 형질전환시스

Fig. 3. Transgene inheritance in the progeny (T₁) of transgenic maize plants. (A) and (B) The expression of phosphinothricin acetyltransferase gene in T₁ *GFP-bar* and *GUS-bar* transgenic maize using PAT test strip, respectively. (C) Herbicide Basta resistance assay. The leaves were scored for herbicide resistance (alive or sensitive/dead) 7 days after herbicide application (upper panel). Transgenic T₁ and non-transgenic control maize plants treated with the herbicide Basta (lower panel). (D) The confirmation of the presence of *GUS*, *GFP*, and *bar* genes using genomic PCR analysis. (E) Semi-quantitative RT-PCR to detect *GFP*, *GUS*, and *bar* gene expression in transgenic plants. *Actin* gene expression was used as a quantitative control. Lanes: M, molecular size marker; PC, positive control; Wt, non-transgenic wild-type; lanes 1-3, selected transgenic lines.

템 정보를 활용하여 국내 주요 옥수수 품종 중에서 Type II 캘러스와 유사한 배발생 캘러스를 형성하는 품종과 계통을 대상으로 형질전환 시스템을 구축하여 옥수수에서 유전자 기능 연구 및 유전자 편집기술 도입을 위한 연구가 필요하다.

적 요

옥수수 Hi IIA미성숙배에 *Agrobacterium*공동배양법을 이용하여 형질전환체를 생산하였다. 옥수수 *Ubiquitin* 프로모터에 리포터 유전자 *GUS* 및 *GFP*를 조합하였고 선발마커로 제초제 저항성 유전자 *bar*와 *mPAT*을 CaMV35S프로모터에 융합하여 제작된 벡터를 *Agrobacterium*균주 LBA4404에 도입 한 후 형질 전환에 이용하였다. 최종적으로 평균 2%의 형질전환 효율을 나타냈으며, Genomic DNA PCR, RT-PCR, 제초제 Basta 저항성 분석을 통해 형질전환체에 외래 유전자가 옥수수 염색체로 도입된 후 발현이 안정적으로 후대까지 유지되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구 결과로부터 국내 환경에서 재배한 HI II계통 옥수수 미성숙 배에 *Agrobacterium*공동배양법을 이용한 형질전환 기술이 확립되었음을 알 수 있었다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ013658)의 지원에 의해 이루어진 것이다. 또한 본 연구는 2019년도 농촌진흥청 국립농업과학원 박사후 연수과정지원사업에 의해 이루어진 것이다.

REFERENCES

1. Char SN, Neelakandan AK, Nahampun H, Frame F, Main M, Spalding MH, Becraft PW, Meyers BC, Walbot V, Wang K, Yang B. 2017. An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotech J* 15: 257-268.
2. Coelho CM, Dante RA, Sabelli PA, Sun Y, Dilkes BP, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA. 2005. Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiol* 138: 2323-2336.
3. Cho MA, Park YO, Kim JS, Park KJ, Min HK, Liu JR, Clemente T, Choi PS. 2005. Production of transgenic maize (*Zea mays* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *J Plant Biotechnol* 32: 91-95.
4. Cho MJ, Wu E, Kwan J, Yu M, Banh J, linn W, Anand A, Li Z, TeTonde S, Register III JC, Jones TJ, Zhao ZY. 2014. *Agrobacterium*-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. *Plant Cell Rep* 33: 1767-1777.
5. Cho MJ, Banh J, Yu M, Kwan J, Jones TJ. 2015. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation frequency in multiple modern elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbreds by media modifications. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 121: 519-529.
6. Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg SEK, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol* 129: 13-22.
7. Frame BR, McMurray JM, Fonger TM, Main ML, Taylor KW, Torney FJ, Paz MM, Wang, K. 2006. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Rep* 25: 1024-1034.
8. Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano M, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams WR Jr, Willetts NG. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.
9. Hamilton CM, Frary A, Lewis C, Tanksley SD. 1996. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9975-9979.
10. Hong JK, Kim S-Y, Kim K-S, Kwon S-J, Kim JS, Kim JA, Lee SI, Lee Y-H. 2013. Overexpression of a *Brassica rapa* MADS-box gene, *BrAGL20*, induces early flowering time phenotypes in *Brassica napus*. *Plant Biotechnol Rep* 7: 231-237.
11. Hong JK, Park KJ, Lee G-S, Kim DY, Kim J-K, Lee SB, Suh EJ, Lee Y-H. 2017a. Callus induction and plant regeneration from immature zygotic embryos of various maize genotypes (*Zea mays* L.). *J Plant Biotechnol* 44: 49-55.
12. Hong JK, Oh S-W, Kim JH, Lee SB, Suh EJ, Lee Y-H. 2017b. Overexpression of *Brassica rapa* *GROWTH-REGULATING FACTOR* genes in *Arabidopsis thaliana* increases organ growth by enhancing cell proliferation. *J Plant Biotech* 44: 271-286.
13. Ishida Y, Hiei Y, Komari T. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nat protocols* 2: 1614-1621.
14. Ishida Y, Satto H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro

- T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nat Biotechnol 14: 745-750.
15. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901-3907.
16. Kim HA, Utomo SD, Kwon SY, Min SR, Kim JS, Yoo HS, Choi PS. 2009. The development of herbicide-resistant maize: stable *Agrobacterium*-mediated transformation of maize using explants of type II embryogenic calli. Plant Biotechnol Rep 3: 277-283.
17. Kim HA, Kwon SY, Yang MS, Choi PS. 2014. Expression of dengue virus EIII domain-coding gene in maize as an edible vaccine candidate. J Plant Biotechnol 41: 50-55.
18. Lee BK, Kennon AR, Chen X, Jung TW, Ahn BO, Lee JY, Zhang ZJ. 2007. Recovery of transgenic events from two highly recalcitrant maize (*Zea mays* L.) genotypes using *Agrobacterium*-mediated standard-binary-vector transformation. Maydica 52: 457-469.
19. Lee H, Zhang ZJ. 2016. Maize (*Zea mays*) Hi-II transformation via *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer. Curr protoc Plant Biol 1: 121-137.
20. Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. 2014. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. J Genet Genomics 41: 63-68.
21. Mookkan M, Nelson-Vasilchik K, Hague J, Zhang ZJ, Kausch AP. 2017. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators *BABY BOOM* and *WUSCHEL2*. Plant Cell Rep 36: 1477-1491.
22. Petrillo CP, Carneiro NP, Purcino AAC, Carvalho CHS, Alves JD, Carneiro AA. 2008. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. Pesq agropec bras Brasília 43: 371-378.
23. Que Q, Elumalai S, Li X, Zhong H, Nalapalli S, Schweiner M, Fei X, Nuccio M, Kelliher T, Gu W, Chen Z, Chilton M-MD. 2014. Maize transformation technology development for commercial event generation. Front Plant Sci 5: 379.
24. Sidorov V, Gilbertson L, Addae R, Duncan D. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. Plant Cell Rep 25: 320-328.
25. Songstad DD, Pertersen CL, Hairston WL, Hinchey B. 1996. Production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi II immature embryos. In Viro Cell Dev Viol Plant 32: 179-183.
26. Svitashv S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK, Cigan AM. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat commun 7: 13274.
27. Vega JM, Yu W, Kennon AR, Chen X, Zhang ZJ. 2008. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. Plant Cell Rep 27: 297-305.
28. Wang AS, Evans RA, Altendorf PR, Hanten JA, Doyle MC, Rosichan JL. 2000. A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. Plant Cell Rep 19: 654-660.
29. Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol 14: 327.
30. Zhao ZY, Gu W, Cai T, Tagliani LA, Hondred DA, Bond D, Krell S, Rudert ML, Bruce WB, Pierce DA. 1998. Molecular analysis of T₀ plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. Maize Genet Coop Newslett 72: 34-37.