

## 배추(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) 약배양시 약의 발달 단계, 온도 처리 및 배지의 종류가 배 발생에 미치는 영향

김태일<sup>1</sup> · 황주광 · 백기엽\*  
원예연구소<sup>1</sup>, 충북대학교 원예학과

### Effect of Developmental Stage, Temperature, and Medium on Embryogenesis in Anther Cultures of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)

Tae Il KIM<sup>1</sup>, Ju Kwang HWANG, and Kee Yeoup PAEK\*

<sup>1</sup>Horticulture Research Institute R.D.A., Suwon 440-310; and Department of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763. \*Corresponding author.

Anthers of hybrids and inbred lines of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) were inoculated on the modified solid or liquid B<sub>5</sub> medium after several pre-treatments. Anthers were then maintained at 25°C after being subjected to various post-treatments. Somatic embryos began to appear 9 days after inoculation and ended at 13th days. Low temperature pre-treatment did not increase embryoid production whereas high post-treatment temperature of 40°C or 45°C did enhance the production. There were considerable levels differences in embryogenesis between lines used, but not between the culture methods. Somatic embryo yield was also increased by subjecting anthers to one day at 35°C and then another one day at 30°C after plating. Histological observations showed several stages in haploid development ranging from a few-celled to large multiple-celled embryoids.

**Key words:** histological observation, inbred line, somatic embryo

배추는 자가불화합성을 가지고 있는 타식성 작물로서 주된 육종 방법은 불화합성을 이용한 일대잡종 생산이다(Tsujimoto and Minato, 1981). 순계를 생산 유지하는 방법으로 뇌수분 방법을 이용하는데 전부 인력에 의존하기 때문에 소요되는 경비가 막대하여 종자 가격이 높아지는 큰 단점이 있다. 이러한 뇌수분 단점을 극복하는 방법중의 하나가 약배양을 통해 반수체를 만들고 염색체를 배가하여 단시일에 동질성을 가진 계통을 만드는 반수체 육종법이다. 반수체 유기가 불가능하고 가능하더라도 유기율이 매우 낮은 원인을 구명하기 위하여 많은 연구를 한 결과 반수체로 되는 화분과 안되는 화분으로 구분되어 그것의 형태적 생리적 특성까지 밝혀진 작물도 있다(George and Narayamaswamy, 1973; Horner and Street, 1978; 1986; Sinha et al., 1978). 그러나 *Brassica* 속 중에서 배추는 약배양의 효율이 계통이나 품종에 따라 차이가 크고 배 발생 빈도가 높지 않은 것으로 알려져 있다.

반수체로 유기가 잘되는 화분을 많이 얻는 방법으로 식물이나 약에 스트레스를 주는 방법, 고체배지 대신 액체배지를 이용하거나 소포자만 직접 배양하는 것 등이 알려져 있다(Huang and Sunderland, 1982; Imamura and Harada, 1980; Sangwan-Norreel, 1977; Spory and Maheshwari, 1976). 따라서 지금까지 알려진 *Brassica*속 및 다른 식물의 약배양 방법을 종합적으로 배추의 약배양에 적용하여 반수체의 유기율을 높이고 또 생존율도 향상시켜 약배양을 배추 육종법중의 하나로 이용하고자 본 실험을 실시하였다.

#### 재료 및 방법

공시재료는 일대잡종과 자식계통을 B<sub>5</sub> 배지에 당 100 mg/L, serine 100 mg/L, glutamin 800 mg/L, 2,4-D 0.1 mg/L, NAA 0.1 mg/L를 첨가하여 사용하였다. 고체배지에서는

0.8%의 박토아가를 첨가하였고, 액체배지는 약을 배지에 띄우는 float culture를 하였으며 패트리디쉬(15 × 87 mm)에 20 mL씩 분주후 약 30개의 약을 띄웠다. 약 접종전 온도처리하는 항온기를 이용하여 40°C, 45°C에서 각각 1시간씩 화서조직을 부착하여 처리하였다. 접종후 온도처리하는 상기 배지에 접종한 약을 25°C로 유지된 배양실에 옮기기 전에 30°C에서 14일, 35°C에서 2일, 35°C에서 1일 처리한 다음 30°C에서 1일, 40°C에서 1일, 40°C에서 1시간 처리를 하여 결과를 매일 조사하였다. 약의 접종시기는 처음에는 현미경 관찰을 통한 1~2핵기의 것을 주로 접종 하였으나 기대했던 것 같이 많은 배상체를 얻지 못해서 꽃잎/약의 길이의 비율이 1/4, 1/2, 2/3로 구분하여 접종하였다. 약의 채취는 오전 10시 이전에 채취하여 sodium hypochlorite 1%에서 10분간 표면살균한 후 살균수로 3회 세척한 다음 현미경하에서 약을 채취하여 처리당 30개씩 접종하였으며 전체 배양약수는 재료의 양에 따라 달리하였으나 평균 200개 이상 접종하였다.

접종후 매일 해부 현미경하에서 배상체 유기를 관찰하였으며 배상체가 엽록체를 형성하면 당을 3%로 낮추고 생장 조절제를 제거한 배지로 옮겨 식물체를 유기 시켰다. 접종한 약의 발달과정을 알아보기 위하여 plastic embedding법 (O'Brien and McCully, 1981)을 이용하였다. 고정액은 phosphate buffer 0.05 M용액에 formaldehyde 2%, glutaraldehyde 2%를 첨가하여 사용하였으며 침투용액 (activator 0.5 g + 50 mL basic resin)으로 침투시킨후 포매하여 마이크로톰으로 6 µm 두께로 절편하였다. 절편조직은 gelatin coating된 슬라이드그라스 위에 놓고 TBO (Toluidine Blue O)로 염색후 DPX mountant고정하여 영구 표본을 제작하였다.

## 결과 및 고찰

대부분 식물에서 약배양의 적기는 1핵기의 소포자가 좋은 것으로 알려져 있으나 토마토에서와 같이 감수분열기가 가장 좋다는 경우도 있다(Keller et al., 1975). *Brassica* 속에서도 1핵기와 2핵기 사이의 화분이 가장 적합하다고 알려져 있는데 Keller 등은 꽃잎/약의 길이의 비로써 적기의 약을 접종하였다(Keller and Armstrong, 1977, 1983). 즉 꽃잎/약이 1/4~1/2의 것이 적기라고 보고했는데 본 실험에서 2개의 계통으로 실험해 본 결과(Table 1) 1/2~2/3가 가장 좋았으므로 이후 실험에는 이 단계의 약을 사용하였다.

육성계통간의 차이는 Table 2에서와 같이 4, 5번 계통은 접종당시와 비교하여 전혀 반응이 없었으나 이들 계통을 교잡육성한 일대잡종인 6번은 5.6%의 반수체 유기율을 보였다. 현재까지 알려진 가장 높은 유기율은 20% 정도로 알려져 있는데(Lee et al., 1986) 1번 계통은 36.1%의 높은 유

**Table 1.** Effect of developmental stage on embryogenesis in anther cultures of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* after 4 weeks in culture.

Breeding line	No. anthers inoculated	Ratio of petal/anther	No. anthers responded	% anther responded
Inbred 1	420	1/4	12	2.9
	510	1/2	20	3.9
	548	2/3	26	5.0
Inbred 3	240	1/4	1	0.4
	240	1/2	1	0.4
	240	2/3	0	0.0

**Table 2.** Effect of methods of cultures on embryogenesis in anther cultures of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* after 4 weeks in culture.

Breeding line	Solid medium			Breeding lines			Liquid medium		
	No. anthers inoculated	No. anthers responded	% of anthers responded	lines	No. anthers inoculated	No. anthers responded	% of anthers responded		
1	180	65	36.1	1	390	82	21.0		
3	138	15	10.9	2	840	71	8.4		
4	360	0	0.0						
5	390	0	0.0						
6	390	22	5.6						

**Table 3.** The effect of pretreatment temperatures on embryogenesis of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* anthers cultured on solid medium after 4 weeks in culture.

Treatment <sup>a</sup>	Breeding line	No. anther inoculated	No. embryos /anthers total	% anthers responded
Control	Inbred 1	630	39	6.2
	Hybrid 2	630	6	1.0
	Hybrid 8	900	35	3.9
	Hybrid 9	1,200	30	2.5
	Total	3,360	109	3.3
40°C	Inbred 1	150	25	16.7
	Hybrid 2	150	1	0.7
	Hybrid 8	210	15	7.2
	Hybrid 9	180	21	11.7
	Total	690	62	9.0
45°C	Inbred 1	1,890	205	10.9
	Hybrid 2	1,140	102	9.0
	Hybrid 8	870	15	1.7
	Hybrid 9	990	9	0.9
	Total	4,890	331	6.8

<sup>a</sup>Anthers were exposed to 40°C or 45°C for one h before inoculation on a solid medium

기율을 보였으며 또한 액체배지에서도 21.0%의 높은 체세포 배의 출현율을 보였다.

**Table 4.** The effect of pretreatment temperatures on embryogenesis of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* anthers cultured on liquid medium after 4 weeks in culture.

Breeding line	Control			Breeding line	Pretreatment at 45°C		
	No. anthers inoculated	No. embryos	% of anthers responded		No. anthers inoculated	No. embryos	% anthers responded
1	420	40	9.5	2	120	14	11.7
2	120	0	0.0	8	360	111	30.8
8	420	259	61.7	9	510	78	15.3
9	450	112	24.9				

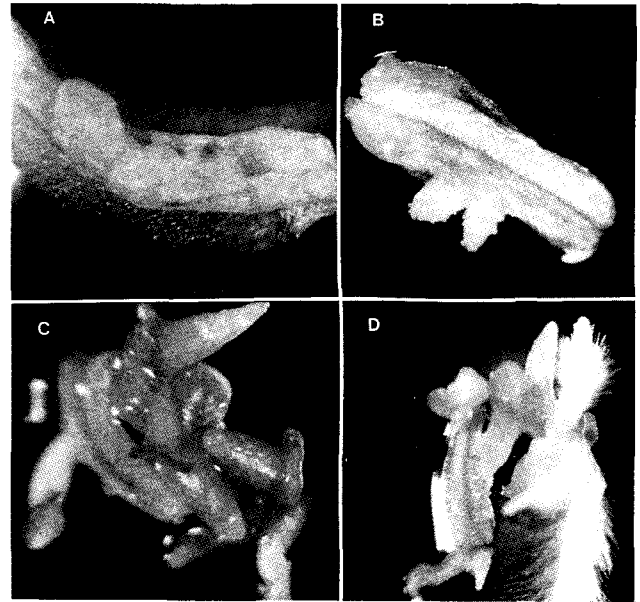
**Table 5.** Effect of temperatures after anther inoculation on embryogenesis in *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* after 4 weeks in culture.

Breeding lines	Treatment <sup>a</sup>	No. anthers inoculated	No. anther responded	% anther responded
Inbred 1	A	240	1	0.4
	B	270	15	5.6
	C	240	18	7.5
	D	180	0	0.0
	E	180	0	0.0
Hybrid 2	A	190	0	0.0
	B	120	15	12.5
	C	90	19	21.1
	D	160	0	0.0
	E	180	0	0.0
Inbred 3	A	180	2	1.1
	B	240	2	0.8
	C	240	5	2.1
	D	120	0	0.0
	E	180	0	0.0

<sup>a</sup> A=1 day at 30°C; B=2 days at 35°C; C=1 day at 35°C, then 1 day at 30°C; D=1 day at 40°C; E=1 hour at 40°C.

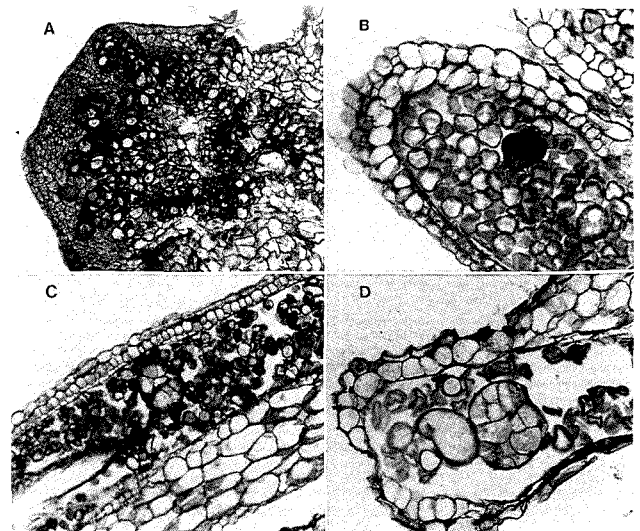
약배양 전처리로서 보고된 저온처리 효과(Keller, 1984; Keller and Armstrong, 1979)는 본 실험 전에 실시한 예비실험에서 효과가 없는 것으로 나타나 여러 육성계통을 가지고 40°C에서 1시간, 45°C에서 1시간 고온처리를 한 결과는 Table 3 및 4와 같다. 40°C 전처리에서는 9.0%의 유기율을, 45°C는 6.8%를 얻었는데 비해 대조구에서는 3.3%의 낮은 유기율을 보였다. 그러나 액체배지를 이용한 약배양에서의 45°C 전처리는 효과가 없었다.

후처리 효과를 알아보기 위해 3가지 품종으로 5가지 처리를 한 결과는 Table 5와 같다. 양배추에서는 45°C에서 한시간 처리후 40°C에서 3시간 처리가 10배 정도의 체세포배 유기율을 높일 수 있다고 보고 하였는데(Keller and Armstrong, 1979) 본 실험에서는 3품종 모두 35°C에서 1일 처리후 30°C로 낮춰서 1일 처리가 반수체 유기율이 좋았고 40°C에서는 반응을 나타내지 않았다. Figure 1은 약에서 체



**Figure 1.** Development of embryoids from anther culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* after 4 weeks in culture.

A= inbred 1 treated 1 day at 30°C  
 B= inbred 3 treated 2 days at 30°C  
 C= hybrid 2 treated 1 day at 35°C, then 1 day at 30°C



**Figure 2.** Structural investigation of cultured anthers of inbred 1 line as affected by temperature treatment after 5 days in culture.

A= 1 day at 35°C, B= 2 days at 35°C  
 C and D= 1 day at 35°C, then 1 day at 30°C

세포배가 발달되는 것을 보여주는 것으로 한개의 약에서 1~35개의 체세포배가 형성되었는데 평균 5개 전후의 체세포배를 관찰할 수 있었고 그 모양과 크기는 매우 다양했다. 자식계통 1의 A처리(Fig. 1A)에서는 배발생은 관찰할 수 있었으나 배의 발달이 불량하였다. 자식계통 3의 B처리(Fig.

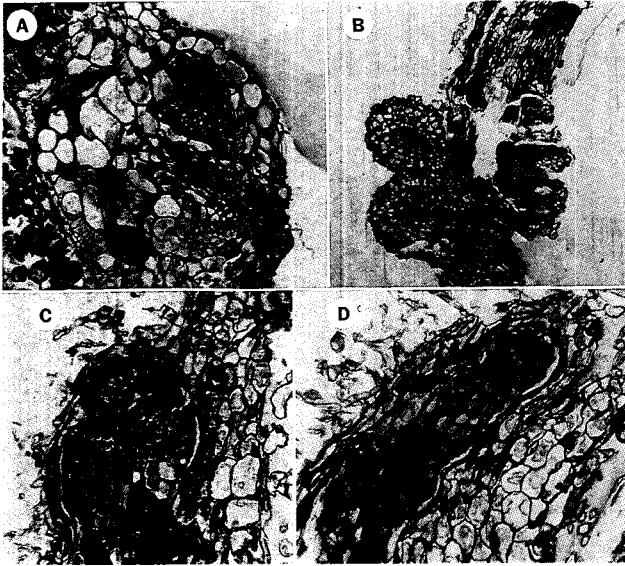


Figure 3. Structural investigation of cultured anthers of hybrid 2 line as affected by temperature treatment after 5 days in culture.

A = 1 day at 35°C, B = 2 days at 35°C

C and D = 1 day at 35°C, then 1 day at 30°C

1B)에서는 형성된 배가 약벽을 뚫고 바깥쪽으로 성장하는 것이 관찰되었으나 체세포배가 엽록소를 형성하여 완전한 식물체로 전환되는 빈도는 낮았다. 한편 교잡종 2에서는 처리방법에 따라 배의 발생수와 발달정도에 차이가 있었는데 35°C에서 2일간 처리했을 경우 배의 발생수 및 발달이 양호하였다(Fig. 1C). 그러나 35°C에서 1일 처리후 30°C에서 1일간 처리하였을 경우 배발생수는 감소하나 조기발아하는 경향을 나타냈다(Fig. 1D).

배양 후 약내 화분의 발달과정을 육성계통과 온도 처리별로 구분하여 조직학적으로 조사해 본 결과는 Figure 2 및 3과 같다. 자식계통 1을 재료로하여 35°C에서 1일간 처리한 약을 배양 5일 후 종단 절편하여 보면(Fig. 2A) 약내 포함한 많은 화분중에서 일부에 세포분열이 일어나는 징후를 관찰할 수 있었다. 그러나 이러한 분열은 연속적으로 이루어지지 않는 것으로 생각되었으며 육안으로 배의 형성을 관찰할 수 있는 빈도는 0.4%에 불과하였다. 그러나 35°C에서 2일간 처리한 화분에서는 극히 일부이긴 하나 세포분열이 연속적으로 이루어져 원배형성이 이루어져 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B).

이와 유사하게 35°C에서 1일 처리한 후 30°C에서 1일 처리한 약에서도 구상형 원배의 형성을 관찰할 수 있었는데(Fig. 2C와 D) 이들 원배중 세포의 분열양상이 뚜렷하지 않고 퇴화되는 것 처럼 보이는 원배도 관찰되었다(Fig. 2D). 이러한 결과로 보아 배양한 약으로부터 배발생은 극히 일부 세포의 분열에 의해 이루어지며 분열이 중지되어 퇴화하는 것도 흔재해 있음을 알 수 있으나 세포의 분열중지의 원인에 대해서는 뚜렷이 알려진 바 없다(Dunwell and

Thurling, 1985; Kameya and Hinta, 1970).

교잡종 2계통에 있어서 35°C에서 1일간 전처리한 약을 조사해보면 약의 내부에서 구상형 배와 같은 것이 형성되어 있으나(Fig. 3A) 약벽을 뚫고 외부로 발달되는 배는 관찰할 수 없었다. 그러나 35°C에서 2일간 전처리한 약을 보면(Fig. 3B) 다수의 형성된 체세포배들이 약벽을 뚫고 성장하는 것을 관찰할 수 있었으며 이들 체세포배는 배양 10일 이후에는 엽록소를 형성하여 녹색을 띠며 어뢰형으로 발달하였다.

한편 35°C에서 1일 처리후 30°C로 온도를 낮추어 1일간 처리하였을 경우 약 내부에서는 세포분열이 진행된 다수의 구상형 배가 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C와 D). 이들 구상형 배들도 배양시간이 경과할수록 약벽을 뚫고 정상적인 배로 발달하였으며 전체 배양한 약의 21.1%가 이와 같은 반응을 보였다. 이상의 결과에서 배양한 약으로부터 배형성은 육성 계통이나 온도처리 방법에 따라 상당한 차이를 보였다. 또한 외관적으로는 관찰할 수 없었으나 약 내부에서 일부 화분들이 세포분열을 하여 원배를 형성하나 이들 배가 더 이상 발달하지 못하고 중도에 퇴화하는 현상을 관찰할 수 있었는데 이는 배 발달과정에 관련된 내적 혹은 배지의 조성이나 물리성과 같은 외적 요인에 의해서 발생된 결과라 추측되었다.

## 적 요

결구배추(*B. campestris* ssp. *pekinensis*)의 약배양을 통한 반수체의 유기율을 높이고 반수체의 발달과정을 알아보기 위해 본 연구를 수행하였다. 결구배추의 일대잡종 및 순계의 약을 수정된 B5 배지에 전처리 및 후처리를 하여 액체 및 고체배지에 배양하였다. 접종후 9일부터 13일까지 반수체가 생겼는데 저온처리 효과는 없었으나 고온인 40°C 1시간, 45°C 1시간 처리는 반수체 유기율을 높였다. 육성계통간에 따라 유기율이 큰 차이가 있었으며 배지는 큰 차이가 없었다. 후처리 효과는 35°C 1일 처리후 30°C 1일 처리효과가 있었으며 40°C 이상 고온처리는 효과가 없었다. 배양한 약을 단계별로 조직학적으로 관찰한 결과 체세포배 유기는 약내 화분으로부터 유기되는 것을 관찰할 수 있다.

## 인 용 문 헌

- Dunwell JM, Thurling N (1985) Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifer*. J Exp Bot 36: 1478 - 91
- George L, Narayanaswamy S (1973) Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. Protoplasma 78: 467 - 470
- Homer M, Street HE (1978) Pollen dimorphism - origin and significance in pollen plant formation by anther culture. Ann Bot 42: 763 - 771

- Huang B, Sunderland N (1982) Temperature – stress pretreatment in barley anther culture. *Ann Bot* 49: 77 – 88
- Imamura J, Harada H (1980) Effects of abscisic acid water stress on the embryo and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tabacum* cv Samsun. *Z Pflanzenphysiol* 100: 285 – 289
- Kameya T, Hinata K (1970) Induction of haploids plant from pollen grains of *Brassica*. *Jap J Breed* 20: 82 – 87
- Keller WA (1984) Anther culture of *Brassica*. In: IK Vasil, ed, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*. Vol. 1. Academic Press, Inc pp 302 – 310.
- Keller WA, Rajathy T, Lacapra J (1975) In vitro production of plant from pollen in *Brassica campestris*. *Can J Gen Cyt* 17: 655 – 666
- Keller WA, Armstrong KC (1977) Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures *Can J Bot* 55: 1383 – 1388
- Keller WA, Armstrong KC (1979) Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther culture by elevated temperature treatment. *Theor Appl Genetics* 55: 65 – 67
- Keller WA, Armstrong KC (1983) Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Euphytica* 32: 151 – 159
- Lee SS, Yoon JY, Oh DK, Woo JG (1986) Anther culture of Chinese cabbage. *Kor J Breed* 18: 1 – 5
- O'Brien TP, McCully ME (1981) *The Study of Plant Structure, Principles and Selected methods*. Ternmarcarphi Pty. LTD., Melbourne, Australia
- Sangwan – Norreel BS (1977) Androgenic stimulating factors in anther and isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* Mill. *J Exp Bot* 28: 843 – 852
- Sinha S, Jha KK, Roy RP (1978) Segmentation pattern of pollen in anther culture of *Solanum surattense*, *Luffa cylindrinca* and *L. echinata*. *Phytomorphology* 28: 43 – 49
- Spory SK, Maheshwari SC (1976) Development of pollen embryoids in anther cultures of *Datura innoxia*. *J Exp Bot* 27: 58 – 68
- Tsujimoto T, Minatok (1981) Use of self incompatibility in hybrid breeding of Chinese Cabbage. In: *Proceedings of the 1st International Symposium of Chinese Cabbage*. AVRDC pp 365 – 377

(1995년 9월 9일 접수)