

소포자 배양에 의한 반수체 식물유도 효율이 높은 국내 유채 품종 선발

박윤정[†] · 김광수 · 장영석 · 김철우 · 방진기

농촌진흥청 작물과학원 목포시험장

Comparison of Frequency Embryogenesis through Microspore Culture of Domestic Cultivars in *Brassica napus* L.

Yoon-Jung Park[†], Kwang-Soo Kim, Young-Seok Jang, Chul-Woo Kim, and Jin-Ki Bang

Mokpo Experiment Station, National Institute of Crop Science, RDA, Muan 530-834, Korea

ABSTRACT This experiment was carried out comparison with haploid plants productivity by microspore culture among domestic cultivars of *Brassica napus* L. Isolated microspore from flower buds were cultured on NLN medium supplemented with 13% sucrose, 0.05 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA. Genotype was important factor in haploid embryo productivity. 'Tamlayuchae' showed the highest haploid embryo production frequency (176 embryos formed from 1 flower bud). But, 'Hallayuchae' and 'Youngsanyuchae' were not generated embryo even cell division. When suspension culture on NLN liquid medium at 100 rpm, embryos were developed multilobe abnormal embryo cluster. Multilobe abnormal embryos on MS medium basal solid medium were regenerated multiple shoots. Regenerated haploid plant with well developed shoots and roots on MS basal medium were successfully transferred to pots.

Keywords : embryo, microspore culture, haploid, rapeseed

육종연한 단축을 위한 반수체 생산으로는 소포자 배양, 약 배양, 자방 배양, 화학약품 처리 등의 방법들이 이용되고 있으며, 이 중 소포자 배양법이 식물체의 재분화 효율이 높아 십자화과 및 화본과에 속하는 식물에서 성공적으로 이용되어 왔다(Lilian *et al.*, 1995). 유채(*B. napus*)의 경우 소포자 배양이 비교적 간편하고 반수체 유기율도 높을 뿐만 아니라 특정 우수형질을 조기에 고정하는 육종기술로 활용되어 유용한 형질을 가진 개체의 선발과 획득이 가능하기 때문에 육종연한을 단축하는데 크게 기여하고 있다. 유채의 소포자 배양 시 반수체의 발생 효율은 유전형, 모식물체의 생육조건, 소포자 발단단계 및 배양밀도 등에 따라 크게 영향을 받

는 것으로 보고되고 있다(Chuong *et al.*, 1988; Dunwell *et al.*, 1985; Thurling *et al.*, 1984). 유채의 소포자 배양을 통한 반수체의 생산 효율은 추파형에 비해 추파형 품종이 매우 낮으며, 국내에서 육성·재배되고 있는 유채는 대부분 추파형이지만 품종에 따른 배발생 효율에 관한 연구가 미진한 실정이다. 따라서 소포자 배양을 통한 배발생법의 확립이 필요할 뿐 아니라 대부분의 재배 품종의 배발생율이 낮기 때문에 품종별로 화퇴의 크기에 따른 소포자의 발달 상태 등의 조사도 반드시 필요하다. 본 연구에서는 국내 육성 유채 품종을 대상으로 소포자 배양을 통하여 doubled-haploid계통을 작성하고 이를 이용하여 유채 지방산 조성 중 올레인산 함량이 높은 품종을 조기에 육성하고자, 각 품종들로부터 화분을 분리·배양하고 품종에 따른 세포의 분열, 배발생 및 반수체 식물의 생산 효율을 비교·관찰하였다.

재료 및 방법

모식물체의 생육조건

본 시험은 목포시험장에서 보유하고 있는 국내 육성 품종인 추파형 '한라유채'를 포함한 8가지 품종을 실험재료로 사용하였다(Table 1). 공시재료는 2005년 9월 20일날 종자를 파종한 다음 본엽이 7~8매 정도까지 전개될 때까지 육묘 후 11월 2일에 시험장 내의 철재파이프로 제작된 400평 규모의 비닐하우스에 정식하고 12월 5일부터 하우스 온도를 20-25℃/8℃(주간/야간)로 조절하여 생육시켜진 식물체를 사용하였다.

소포자의 분리

소포자를 분리하기 위한 화퇴는 각 품종별로 꽃이 6~9개 정도 개화하기 시작할 때의 화서를 채취하여 화퇴의 길

[†]Corresponding author: (Phone) +82-61-450-0133
(E-mail) fragrant20@naver.com

결과 및 고찰

이를 3.0-3.5 mm, 3.5-4.0 mm 및 4.0-4.5 mm의 3집단으로 구분하였으며 이들 각각 집단으로부터 각각 15개 정도의 화뢰를 선별하여 70% EtOH에 30초간 처리한 다음, tween 20이 첨가된 1% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 표면 살균 후 멸균수로 4회 세척하였다. 표면살균된 화뢰들을 비커에 넣고 13% sucrose가 첨가된 B₅(Gamborg *et al.*, 1968) 배지 10 ml을 부은 후 균질기로 화뢰를 으깨어 소포자를 분리하였다. 각 집단의 소포자 현탁액을 nylon mesh(직경 42 μ m)로 여과한 다음, 15 ml의 시험관에 부은 후 B₅(suc.13%) 배지로 10 ml을 맞추고 1,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 재차 B₅배지 10 ml로 재현탁한 후 1,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 소포자들을 세척하는 과정을 2회 반복하였다. 마지막 원심분리 후에 상등액을 버리고 침전된 소포자에 2 ml의 B₅배지로 조심스럽게 현탁하고 활력이 높은 소포자만을 분리하기 위해 24/32/40%의 percoll을 각각 3 ml씩 시험관에 층을 이루도록 천천히 부은 후 원심분리(1,000 rpm, 5 min)하고 32% percoll 층에 분리된 소포자들만을 파스퇴르피펫을 이용하여 취한 후 B₅배지를 5 ml씩 가하여 1,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 다시 침전물에 B₅배지를 5 ml 가하여 현탁 시킨 후 혈구계수기를 이용하여 소포자의 밀도를 측정하고 원심분리 하였다. NLN 배지(Nitsch & Nitsch, 1967)와 1/2NLN 배지에 13% sucrose, 30 mg/l glutathione, 800 mg/l L-glutamine, 100 mg/l L-serine, 0.5 mg/l naphthaleneacetic acid(NAA)와 0.05 mg/l benzyladenine(BA)를 첨가한 액체배지로 소포자 밀도가 5×10^4 가 되도록 조절하여 패트리 디쉬(35 mm \times 10 mm, FALCON)에 배양하였다. 초기배양 온도를 32.5°C로 하여 암상태에서 배양한 다음 25°C 암상태로 옮겨서 배양을 지속하였다.

식물재분화

소포자배양을 통하여 형성된 배를 100 ml 삼각플라스크에 30 ml NLN 액체배지 와 100 rpm에서 암상태로 2주마다 계대배양을 하면서 진탕배양 하였다. 반수체 식물체의 유기를 위하여 액체진탕배양을 통해 형성된 multilobe abnormal embryo를 3% sucrose가 첨가된 Murashige and Skoog(MS) 고체배지에 치상하고 25°C에서 16-h/day 광주기 상태에서 배양하였다. Multilobe로부터 다수의 싹초가 형성되면 배양 병에 옮겨 치상하였다.

국내 육성 추파형 유채의 소포자 배양을 통한 화뢰의 크기에 따른 배발생 빈도를 조사하였다. 소포자 배양 초기의 세포분열 및 배발생의 촉진을 위해 배양 초기온도를 32.5°C로 하여 3일간 배양하고 이후의 배양온도는 25°C에서 암배양 하였다. 배양 관찰 결과, 세포의 팽창은 배양 1일 후면 나타났다(Fig. 1A), 배양 2-3일 후에 첫 번째 세포분열이 일어나 두개의 똑같은 크기의 양분된 세포들을 볼 수 있었으며 온도 처리를 25°C로 하여 배양한 후 급속한 세포분열이 일어났다(Fig. 1B). 배양 후 7일 정도가 되면 소포자의 반복되는 세포분열에 의해 원형의 다세포구조를 형성하였으며 세포분열을 거듭하면서 캘러스와 같은 거대구조를 형성하였다(Fig. 1C). 배양 3주 후에는 globular-shape을 갖는 배상체가 형성되었다(Fig. 1D). 배양 후 4주가 경과하면 globular-shape형에서 heart-shape와 torpedo-shape가 형성되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1E, 1F). 이와 같이 유채 소포자 배양의 경우 추파

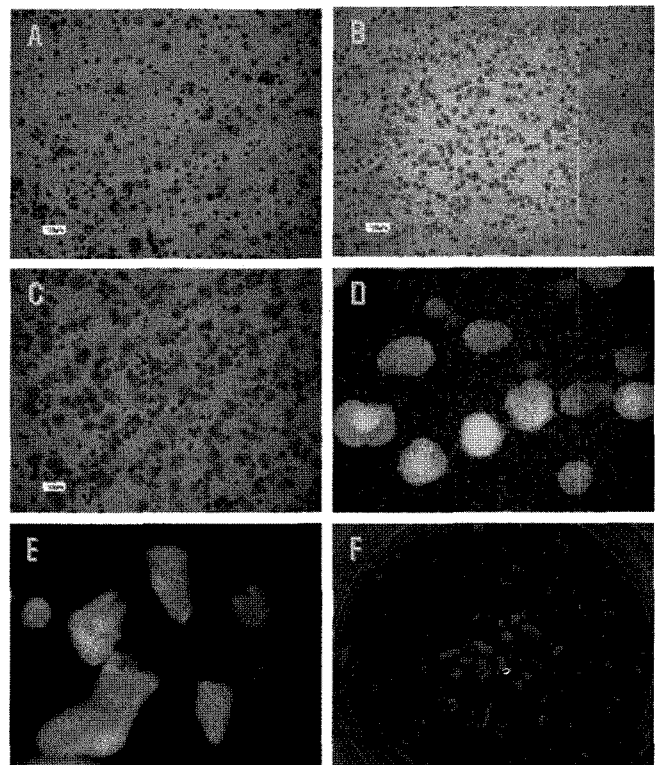


Fig 1. Induction of embryogenesis from isolated microspores culture. A : Freshly isolated microspores; B : First division after 2days in culture; C : Cell clusters formation after 1 weeks in culture; D : Globular embryos formation after 3 weeks in culture; E, F : Heart and torpedo embryos formation after 4 weeks in culture.

형은 배양 2일 후에 세포분열이 배양 20일 후에 구형의 배상체가 관찰되었으나, 24시간이 경과되면 첫 번째 분열이 시작되고 16일째가 되면 구형의 배상체를 형성하는 춘파형(Jang *et al.*, 2000)에 비해 비교적 세포분열 및 배 형성에 소요되는 기간이 길었다.

각각의 품종별 화뢰크기에 대한 배발생 반응을 보면, ‘한라유채’는 화뢰크기와 상관없이 세포팽창과 세포분열이 전혀 일어나지 않았고, ‘영산유채’의 경우는 세포팽창과 세포분열의 빈도는 매우 낮았지만 배형성이 이루어지지 않았다. ‘탐라유채’는 대부분 1핵기말기로 구성된 3.5-4.0 mm 화뢰크기와 2핵기화분과 3핵기화분으로 구성된 4.0-4.5 mm 화뢰크기에서 세포팽창과 세포분열이 일어났으며, 배양 3주 후에는 약 172개의 배가 형성되어 배발생 빈도가 가장 높게 나타났으며, 4.0-4.5 mm크기에서 다핵성세포구조가 40%이상으로 발달하여 85개의 배가 형성되었다. ‘탐미유채’는 다

른 품종에 비해 높은 빈도의 세포팽창을 보인 반면, 세포분열은 낮은 빈도로 발생하였으며, 3.5-4.0 mm 크기에서는 세포분열이 일어나 92개의 배가 형성되었으며, 4.0-4.5 mm 크기에서는 세포분열이 일어나지 않았다.

‘목포64호’는 3.0-3.5 mm 화뢰크기에서는 세포팽창과 세포분열이 전혀 일어나지 않았으며, 3.5-4.0 mm 화뢰크기에서는 세포팽창과 분열이 발생하여 다핵성구조로 발달하여 12개의 배가 형성되었고 4.0-4.5 mm 크기에서는 10%미만의 소포자만이 세포팽창과 세포분열이 발생하였다. ‘목포 68호’, ‘목포111호’, ‘MS-B Line’은 3.5-4.0 mm 크기의 화뢰로부터 적출한 소포자에서만 세포팽창과 세포분열 및 다핵성세포구조가 나타났으며, ‘목포 111’호와 ‘MS-B Line’에서는 다핵성세포구조가 약 40%미만으로 관찰되었으며, ‘목포 68호’는 45개, ‘목포111호’는 72개의 배가 형성되었으며 ‘MS-B Line’는 51개의 배가 형성되었다(Table 1).

Table 1. Comparison of genotype, flower bud size and nuclear stage on embryo generation from microspore culture of *B. napus*.

Variety	bud-size	Cell growth	Cell division	Cell cluster formation	Embryo* number
Halla	3.0-3.5	-	-	-	-
	3.5-4.0	-	-	-	-
	4.0-4.5	-	-	-	-
Tamla	3.0-3.5	-	-	-	-
	3.5-4.0	++	+	++	176
	4.0-4.5	+	++	+++	85
Tammi	3.0-3.5	++	+	-	-
	3.5-4.0	++	+	++	92
	4.0-4.5	+++	-	-	-
Youngsan	3.0-3.5	-	-	-	-
	3.5-4.0	+	+	-	-
	4.0-4.5	-	-	-	-
Mokpo 64 [#]	3.0-3.5	-	-	-	-
	3.5-4.0	+	+	+	12
	4.0-4.5	+	+	-	-
Mokpo 68 [#]	3.0-3.5	-	-	-	-
	3.5-4.0	+	+	+	45
	4.0-4.5	-	-	-	-
Mokpo 111 [#]	3.0-3.5	-	-	-	-
	3.5-4.0	+	+	++	72
	4.0-4.5	-	-	-	-
MB-B Line	3.0-3.5	-	-	-	-
	3.5-4.0	+	+	++	51
	4.0-4.5	-	-	-	-

*No. of embryos per 1×10^5 microspore cultured.

- : none, + : below 10%, ++ : 10-30%, +++ : above 30%.

‘한라유채’를 제외하고는 3.5-4.0 mm 크기에서 모든 품종이 세포생장, 세포분열 및 다핵성세포구조가 관찰되었으며 ‘탐라유채’의 경우는 더 큰 크기인 4.0-4.5 mm에서도 배발생이 관찰되었다. ‘탐라유채’, ‘탐미유채’, ‘목포64호’, ‘목포68’, ‘목포111호’ 및 ‘MS-B Line’ 만이 배형성이 관찰되었으며, 그 중에 ‘탐라유채’와 ‘목포64호’만이 정상적인 반수체 식물로 재분화가 되었다. ‘탐라’유채는 1/2NLN배지가 NLN 배지에 비해 배발생이 약 2배 정도 높았으며, ‘탐미유채’를 포함한 다른 품종은 NLN 배지가 1/2NLN 배지에 비해 배발생 효율이 비슷하거나 조금 높았다(no show data). Jang *et al.*(1997)에 따르면 ‘한라유채’, ‘영산유채’의 두 품종 모두 1핵기말기의 소포자가 포함되어 있는 2.8-3.2 mm 크기의 화퇴에서 배발생 비율이 가장 높은 것으로 보고하였다. 또한 Bang *et al.*(1991)은 ‘영산유채’가 배발생 비율이 152개

(embryos/bud)로 나타났고, ‘한라유채’는 144개(embryos/bud)로 배발생 비율이 높은 것으로 보고하였다. 본 실험의 결과에서는 ‘한라유채’는 전혀 반응이 없었고 ‘영산유채’에서만 세포생장과 세포분열이 낮은 빈도로 발생했던 것과 큰 차이를 보이는데, 이는 외관상의 화퇴크기 보다는 생체 내의 화분발육의 상태 중 1핵기말기 상태의 소포자의 확보에 따라 배발생 효율에 차이가 나타나는 것으로 생각된다.

소포자 배양을 통해 형성된 배를 NLN 액체배지에 2주간격으로 계대배양하면서 암상태에서 현탁배양 하였다(Fig. 2A). 이때, ‘MS-B Line’과 ‘탐미유채’ 품종에서는 식물체의 발생없이 배상체로부터 바로 뿌리가 형성이 되었으며, ‘탐라유채’와 ‘목포 68호’ 품종에서는 배상체로부터 뿌리가 형성되는 것과 multilobe로 발달하는 것도 있었다. 현탁배양을 통해 형성된 Multilobe를 성장조절제가 첨가되지 않는 MS

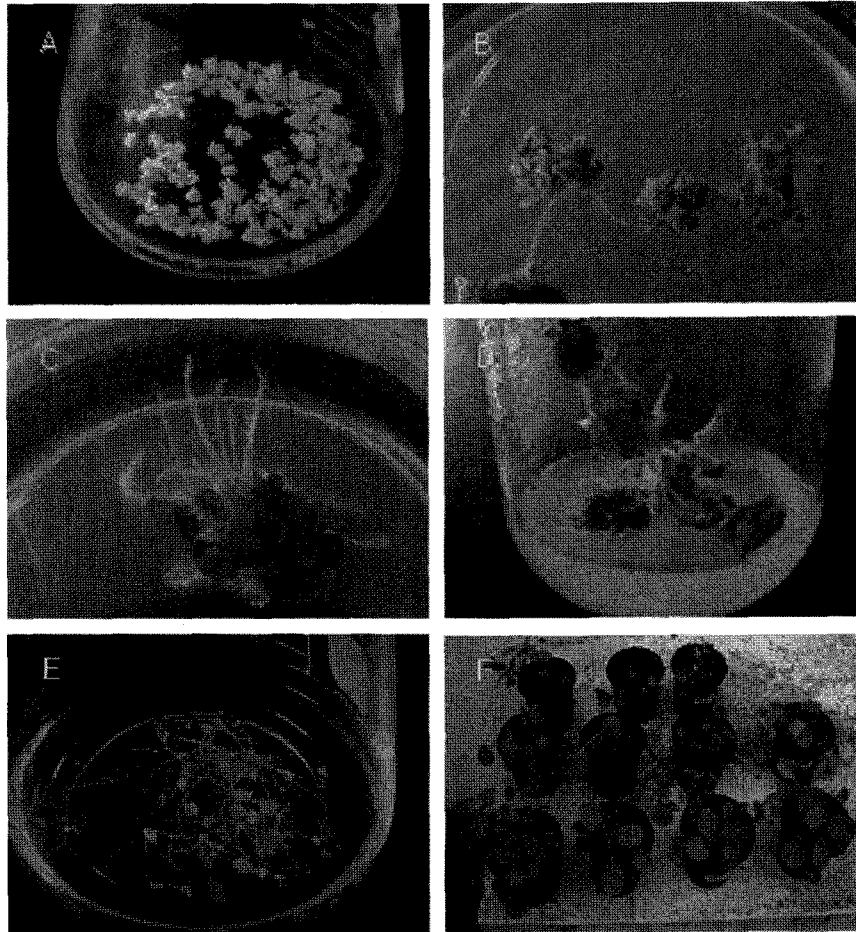


Fig 2. Formation of multilobe abnormal embryos by suspension culture and regeneration of multiple shoot through embryo. A : Embryo suspension culture; B : Formation of multilobe abnormal embryo; C : Multiple shoot formation from multilobe abnormal embryo; D : Regenerated haploid-plant; E: Adventitious root formation from embryo; F : Regenerated plants grown in pots.

인용문헌

고체배지에 치상하여 명상태(12h/12h)에서 배양하면 Multilobe로부터 다수의 신초가 형성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 재분화된 신초의 정단으로부터 약 3-4마디만을 절단하여 MS 배지가 든 배양병으로 옮겨 배양하여 뿌리를 유도하였다(Fig. 2C, 2D). 식물체로부터 뿌리가 발생하면 배양병에서 꺼낸 후 흐르는 물에서 배지를 깨끗하게 세척한 후 사각 플라스틱 포트(33×40×8 cm)에 토양유실을 막기 위한 망을 바닥에 깔고, 그 위에 상토(바이오상토, 흥모종묘)와 모래를 같은 비율로 섞은 후 식물체를 정식하여 순화시켰다(Fig. 2E, 2F).

적 요

국내육성 유채품종 간 반수체식물 생산성을 비교하였다. 화아로부터 분리된 소포자를 13%의 sucrose, 0.05 mg/ℓ BA와 0.5 mg/ℓ의 NAA가 첨가된 NLN 배지에서 배양하였다. 반수체 배의 생산에는 유전형이 중요한 요인이었으며, 탐라유채가 가장 높은 반수체 배 생산능을 보여 화아당 176개의 반수체 배가 발생하였으나, 한라유채와 영산유채는 배 생산은 물론 세포분열도 관찰되지 않았다. 발생한 반수체 배를 NLN배지에서 현탁배양하여 Multilobe abnormal embryos를 형성시켰으며, 계속하여 성장조절제가 첨가되지 않은 MS고체배지에 치상 배양하여 반수체식물체를 유도 하였다. 재생된 반수체 식물체는 성공적으로 순화되었다.

Bang, J. K., J. I. Lee, and S. K. Laima. 1991. Embryogenesis and Plant Regeneration in Rapeseed Microspore Culture. *Korea J. Breed.* 23(3) : 257-262.

Chuong, P. V., and W. D. Beversdorf. 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. *Plant Sci.* 39 : 219-226.

Dunwell, J. M., M. Cornish, and A.G.L. Decourcel. 1985. Influence of genotype, plant growth temperature and anther incubation temperature on microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *Oleifera*. *J. og Experimental Bot.* 36 (165) : 679-689.

Jang, Y. S., K. S. Min, Y. B. Oh, D. H. Chung, and J. H. Park. 2000. Comparisons of Pollen Development *in vivo* and *in vitro* Culture between Spring and winter Rapes. *Korea J. Breed.* 32(2) : 179-185.

Jang, Y. S., K. S. Min, Y. B. Oh, and D. H. Chung. 1997. *In vitro* embryogenesis of Haploids from Isolated Microspores of Oil Seed Rape (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*). *Korea J. Breed.* 29(4) : 474-479.

Lilian Nehlin, C. Möllers, and K. Glimelius. 1995. Induction of secondary embryogenesis in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. *Plant Sci.* 111 : 219-227.

Thurling N. P., and P. M. Chay. 1984. The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Ann. Bot.* 54 : 681-693.