

양배추와 무의 동형 원형질체 융합을 이용한 식물체의 재분화

인동수, 송민정, 장인창, 민병환¹, 남석현, 신종섭, 이시우, 한지학*
(주) 농우바이오 생명공학연구소, ¹경북대학교 생명자원과학대학 식물자원학과

Regeneration of symmetric protoplast fusion between cabbage (*Brassica oleracea* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.)

Dong Su In, Min Jung Song, In Chang Jang, Byung Whan Min¹,
Seok Hyeon Nahm, Jong Sub Shin, See Woo Lee, and Chee Hark Harn*

Biotechnology Institute, Nongwoo Bio Co., Ltd., Yeosu, Gyeonggi, Korea

¹Dept. of Plant Resources, Kyungpook National University, Sangju, Kyungpook, Korea

ABSTRACT Protoplasts from cabbage and radish were isolated and fused symmetrically by PEG treatment. The PEG treated mixture of high concentrated protoplasts produced lots of micro-calli after 2~3 weeks. The microcalli developed to normal calli and shoots were regenerated from the calli. A total of 218 shoots were regenerated, but none of them contained the NWB-CMS specific DNA marker, indicating that the transfer of the radish NWB-CMS character into cabbage did not occur. However, ISSR analysis revealed that the cell fusion between protoplasts from radish and cabbage was occurred (3 out of 208 plantlet). The fused regenerants possessed the characteristics of source plants used for protoplast fusion. After vernalization, three regenerants were flowered with white petal color as seen in radish. Only three seeds were able to obtain from one regenerant by backcrossing with the cabbage pollen.

서 론

십자화과 (Brassicaceae)는 양배추, 배추, 브로콜리, 유채 등 많은 엽·양채류를 포함하고 있는 중요한 분류군이다. 일반적으로 십자화과는 F₁ 육종이 중요한 작물로, 많은 육종적인 연구가 진행되고 있으며, 대부분의 육종회사에서는 고순도의 F₁ 종자를 채종하기 위해 자가불화합성과 융성불임 (Cytoplasmic Male Sterility: CMS)을 이용하고 있다. 이중 융성불임 육종 시스템은 십자화과 식물에서 Ogura, Polima, Anand 등이 융성불임 소재로 이용되고 있다. 그런데 융성 불임 인자는 세포질 유전의 특성을 가지고 있어 현실적으로 교배를 통해서 이 특성의 전이가 어려웠다. 1980년대 초에 원형

질체 융합 기술의 발달로 세포질 융성불임 형질의 전이가 이루어졌으며 (Pelletier et al. 1983), 이 기술을 통하여 전이된 융성불임인자는 이후 십자화과 작물의 육종에 이용되어 왔다 (L'Homme and Brown 1993; Handa et al. 1995; Cardi and Earle 1997; Walters et al. 1992). 현재도 많은 종자회사와 대학에서 지속적으로 융성 불임의 개발 및 개량에 힘쓰고 있고, 최근에는 마키 검색, 염기서열 분석 등을 바탕으로 융성불임을 이해하는 연구와 (Murayama et al. 2003; Brown et al. 2003; Singh et al. 1996) 인위적인 유전자의 형질전환을 통해 융성불임기작 연구가 진행되고 있다 (Kim et al. 2007).

우리나라에서는 최근까지 독자적인 융성불임작물의 개발에 필요한 상업적 융성불임 계통이 존재하지 않았다. 최근 (주)농우바이오에서는 무에서 NWB-CMS라는 독자적인 융성 불임계통을 개발하여 이를 특허등록 하였고 (Nahm et al. 2005) 이를 무의 육성프로그램에 적용하고 있다. 현재 (주)

*Corresponding author Tel 031-883-7055 Fax 031-884-7065

E-mail: chharm@nongwoobio.co.kr

농우바이오는 개발한 NWB-CMS 인자를 십자화과 작물에 전이시켜 십자화과 전체작물의 육종에 이용하기 위한 육성 소재를 개발하고자 한다. 이를 위하여 먼저 양배추와 무의 원형질체를 대칭융합을 통하여 식물체를 확보하고 세포융합 시스템이 정상적으로 진행되는지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험재료로 사용한 종자는 (주)농우바이오에서 육성한 양배추 순계인 HNA과 NWB-CMS 형질을 가진 F₁ 계열의 무를 무균발아하여 사용하였다.

원형질 분리

무균발아 후 5~21일이 지난 양배추의 하배축과 무의 잎을 메스로 잘게 썬 후 원형질 분리를 위한 효소 Cellulase Onozuka RS (SERVA Electrophoresis, Germany) 1~2%, Macerozyme (SERVA Electrophoresis, Germany) 0.1~0.5%, Pectolyase (YAKULT, Japan) 0.1%를 여러 농도로 조합하여 0.4 M mannitol 용액에 첨가하고, 28°C의 암상태에서 12시간가량 30~40 RPM으로 진탕하였다. 각 처리구별로 효소 처리가 끝난 조직을 125 μ m와 80 μ m의 pore size 스텐레스망을 통과시킨 후, 15 mL conical tube에 원형질체만 모아 100xg에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 침강한 원형질체를 CPW + 0.4 M mannitol 용액에 희석한 뒤 (Frearson et al. 1973), CPW + 21% Sucrose 용액을 이용하여 100xg에서 5분간 밀도구배 원심분리하여 상층부에 형성된 밴드에서 순수한 원형질체만을 분리하고 W₅ 용액으로 3회 수세하여 CPW + 0.4 M mannitol 용액에 원형질체를 현탁 한 뒤 혈구측정기를 이용하여 농도를 측정하였다.

원형질 융합

원형질 융합은 PEG (M.W. 8000, 25%) 방법을 약간 변형하여 이용하였다 (Yamanaka et al. 1992). 먼저 분리된 원형질체의 밀도는 양배추는 2×10^6 /mL로, 무는 4×10^6 /mL의 농도로 원형질체를 현탁희석용액 (CPW + 0.4 M mannitol)으로 조절하고 각각 부피비율 1:1로 고르게 섞은 뒤 원형질체 혼합물 약 150 μ L를 페트리디쉬에 떨어뜨리고 융합유도제

(30% PEG 용액 + DMSO) 150 μ L를 첨가하여 잘 섞이게 흔들어 주었다. 이후 High pH, High Ca²⁺ 용액 150 μ L를 첨가한 뒤 해부현미경에서 융합을 확인하고 1 mL W₅ 용액을 첨가하여 상등액을 파스퇴르 파이펫으로 제거하였다 (Keller et al. 1973). 이후 W₅ 용액으로 5회 수세한 후, 마지막 단계에서 배양배지로 수세 후 최종적으로 2 mL의 배양배지로 배양을 실시하였다.

융합체 배양

PEG로 융합된 원형질체는 2% glucose, 7% mannitol, BAP 1 mg/L, NAA 1 mg/L, 2,4-D 0.25 mg/L가 첨가된 MS 액체배지에서 25°C의 암상태에서 배양을 실시하였다. 약 3~4주의 배양을 지속하면 육안으로 미소괴를 관찰하고 이를 kinetin 5 mg/L, 2,4-D 0.5 mg/L가 첨가된 MS 반고체 배지로 옮겨서 16:8 (광:암)의 배양실에서 캘러스의 발달을 유도하였다. 유도된 캘러스는 Zeatin 2 mg/L, GA₃ 0.035 mg/L + agar 1.6%가 첨가된 MS 배지에서 싹을 유도하고, 유도된 싹은 호르몬이 첨가되지 않은 1/2 MS 배지에서 뿌리를 유도 후 순화하여 온실에서 외부형태를 관찰하였다.

마커 분석

웅성불임인자를 전이를 확인하기 위해 양배추와 무와 융합체의 잎으로부터 Dellaporta 등 (1983)의 방법을 약간 변형하여 Genomic DNA를 추출하였다. Primer는 NWB 웅성불임 특이적인 조합과 (Nahm et al. 2005), 핵의 융합 여부를 확인을 위한 양배추와 무에서 서로 다른 특이적인 밴드를 보이는 ISSR primer 834: 5' -AGAGAGAGAGAGAGAG(CT)T-3', 853: 5'-TCTCTCTCTCTCTC(AG)T-3'을 사용하였고, Ex-Taq polymerase (Takara Co.)로 PCR 반응을 수행하였다. PCR 조건은 pre-denaturation은 94°C에서 5분간, 이후 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 50°C 1분, extension은 72°C에서 1분간 45 cycle을 하였으며 last extension은 72°C에서 5분간 수행하였다. 합성된 DNA는 1% agarose gel에서 전기영동 후, 밴드의 양상을 관찰하였다.

형태적 관찰

양배추와 무의 원형질체 융합을 통해 재분화된 개체 중 PCR 반응에서 NWB-CMS 계통의 미토콘드리아가 전이된

것으로 확인된 개체를 대상으로 2달간의 저온 춘화처리를 통하여 원형질융합체를 개화시켜 화기구조 및 형태적 특성을 조사하고 결실 및 종자발달 여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

원형질 분리

원형질 분리에 영향을 미치는 조건들로는 전처리의 유무와 원형질 분리 효소의 종류와 농도 등이 있다. 원형질 분리 효소를 처리하기 전에 CPW13M, TVL 용액 등의 고장액으로 삼투작용이 일어나도록 처리하면 원형질 분리 효율이 높아지는데 (Lian and Lim 2001), 본 실험에서도 효소처리 전에 각각의 재료들을 TVL 용액에 1~2시간 동안 침지한 뒤에 원형질을 분리해본 결과 역시 원형질 분리 효율이 높은 것을 확인할 수 있었다 (데이터 미제시). 또한 원형질 분리 효율을 높이기 위하여 원형질 분리 효소의 종류와 농도가 중요하여 처리구 모두를 고장액인 TVL 용액으로 침지한 후 여러 효소 조합별 원형질 유리 정도를 확인하였다 (Table 1). 일반적으로 원형질체를 분리하기 위해 Cellulase와 Macerozyme의 조합을 사용하고 일부 효율을 높이기 위해 Pectolyase를 이용하기도 한다. 본 실험에서는 각각의 식물재료에 따른 최적화된 효소 조합을 조사하였다. 먼저 양배추의 하배축을 이용한 실험에서 Cellulase 1%, Macerozyme 0.1%를 기준으로 Macerozyme의 농도를 2배로 하여 원형질 분리를 수행해본 결과 원형질체 유리율이 약 20배 정도 높아졌으며 이 조건에서 다시 Cellulase의 농도를 2배로 올렸을 때 원형질체의 유리가 다시 약 4.5배가 높아지는 것을 확인하였다. 이와는 독립적으로 Cellulase 1%, Macerozyme 0.5% Pectolyase 0.1%를 첨가한 효소조합의 분리율은 Cellulase 2%, Macerozyme 0.2%에 비하여서도 다시 3배 정도 증가하였다. 이는 최초

Cellulase 1%, Macerozyme 0.1%의 효소조합에 비하여 약 93배 정도가 유리된 것으로 이 조합을 양배추의 원형질분리에 이용하였다. 일반적으로 양배추의 하배축에서 유래된 원형질체는 30~120 μm 정도의 크기를 보였으며, 무의 잎으로부터 유리한 원형질체는 약 20~40 μm 의 크기로 상대적으로 작았으나 원형질체 수가 매우 많았다. 따라서 특별히 Pectolyase 첨가 없이 Cellulase 2%, Macerozyme 0.2%의 효소조합을 선택하여 사용하였다. 위의 결과를 통해 원형질체 유리를 위한 중요 요인은 배양에 사용하는 식물조직의 세포벽을 효율적으로 녹일 수 있는 적절한 효소의 조합과 농도이며 또한 고장액을 이용한 전처리 역시 중요함을 확인하였다. 이 밖에도 원형질 분리에 사용되는 식물의 종류, 조직의 종류, 식물의 생육 조건, 원형질 분리 온도 및 시간, 진탕 속도와 시간도 원형질 분리에 영향을 미치는 것으로 실험을 통해 알 수 있었다 (데이터 미제시).

원형질 융합과 융합체의 재분화

양배추의 하배축과 NWB-CMS 무의 잎으로부터 분리된 원형질체 (Fig. 1A, B)를 PEG 8000을 이용하여 화학적 융합 방법으로 원형질 융합을 수행하였다. 분리된 각각의 원형질

Table 1 Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation yields of cabbage and radish with 1 hr. TVL pretreatment.

	Enzyme (%)			No. of protoplast (per mL)
	Cellulase	Macerozyme	Pectolyase	
<i>Brassica oleracea</i> hypocotyl	1	0.1		$1.57 \pm 1.43 \times 10^5$
	1	0.2		$3.27 \pm 1.17 \times 10^6$
	1	0.5	0.1	$4.43 \pm 1.46 \times 10^7$
<i>Raphanus sativus</i> leaf	2	0.2		$1.46 \pm 0.50 \times 10^7$
	1	0.1		$9.67 \pm 2.52 \times 10^7$
	2	0.2		$2.86 \pm 0.32 \times 10^8$

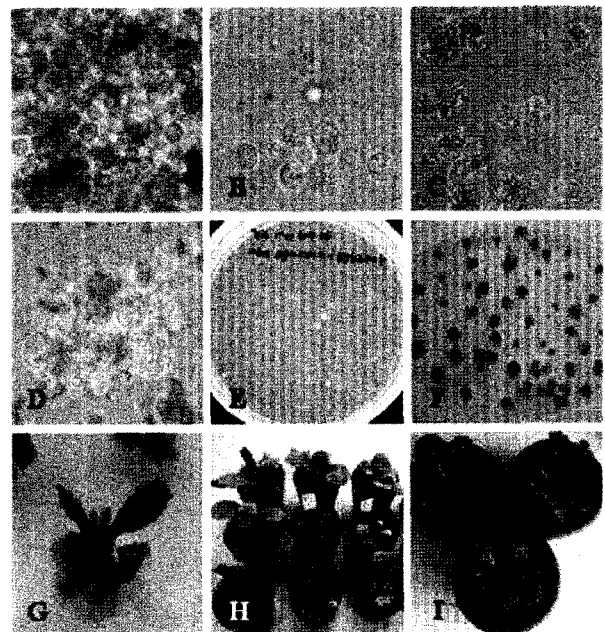


Figure 1. Establishment of a symmetric protoplast fusion system of *B. oleracea* and *R. sativus* by PEG Method. A: *R. sativus* protoplast; B: *B. oleracea* protoplast; C: protoplasts at 10 min. after PEG8000; D: divisions of fused cell; E: fused cell microcalli formation after 1 month culture; F: callus development; G: shoot regeneration; H~I: young putative fusion plants.

을 부피비 1:1 비율로 섞은 후 약 10분 정도의 원형질 침지 과정을 거친 후 PEG 용합 용액을 첨가하면 각각의 원형질체의 간극이 서서히 줄어들면서 융합이 되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1C). PEG를 이용한 원형질체 융합은 해부현미경하에서 수행하였으며 약 5~10분 정도의 시간이 소요되었다. 융합이 진행된 후 원형질체는 배양 3~4일 후에 제1분열이 시작되었으며 약 2~3주 후에는 미소괴로 발달하였다 (Fig. 1D). 약 4~6 주경에는 육안으로 확인할 수 있는 캘러스로 발달하였다 (Fig. 1E). 정상적으로 발달한 캘러스 약 3500개를 재분화배지로 옮겨 (Fig. 1F) 재분화를 유도하여 218개의 신초를 얻어 재분화율은 약 6.2%이었다 (Fig. 1G). 재분화된 신초는 호르몬이 첨가되지 않은 1/2 MS 배지에서 발근을 유도한 후 순화하여 (Fig. 1H) 온실에서 재배하였다 (Fig. 1I).

융합 유래 식물체의 마커 분석

218개의 신초 중에 순화하여 온실에 옮긴 원형질융합 유래 재분화체 중, 정상적으로 발달한 208개의 독립적인 개체로부터 융합여부를 확인하기 위하여 본엽이 2~3매 출현한 시기에 각각 본엽을 채취하여 DNA를 추출하였다. NWB-CMS 특이 Primer를 이용하여 PCR 반응을 한 결과 NWB-CMS에 특이적인 PCR 산물을 확인 할 수 없었다 (Fig. 2A). 따라서, 원형질융합을 통하여 무의 세포질의 유전물질의 전이가 일어나지 않은 것으로 추정할 수 있었다. 이에 원형질체 융합이 통해 정상적으로 세포융합이 일어났는지를 확인하기 위해 각각 무와 양배추에서 게놈에 특이적인 밴드를 보이는 ISSR Primer (834, 853)를 이용하여 PCR 반응 결과 208 개의 독립 개체 중 3 개체에서 무와 양배추에 특이적인 밴드를 모두 가지고 있는 개체를 확인할 수 있었다 (Fig. 2B, C). 따라서 PEG 융합을 통하여 재분화된 개체 중 1.4%에서 원형질체간의 융합이 일어났음을 확인할 수 있었다.

융합 개체의 형태 및 개화

PCR분석 결과 NWB-CMS 무와 양배추간의 핵의 융합이 일어난 것으로 확인된 3개의 독립개체는 발근과 개체의 발달 과정에서는 특이할 만한 사항은 없었다. 그러나 형태적으로 정도의 차이는 있었으나 무와 양배추의 중간형태의 잎을 가지고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 3A, B, C). 이들 세포 융합체들은 2달간의 저온처리를 하는 춘화처리로 개화를 유

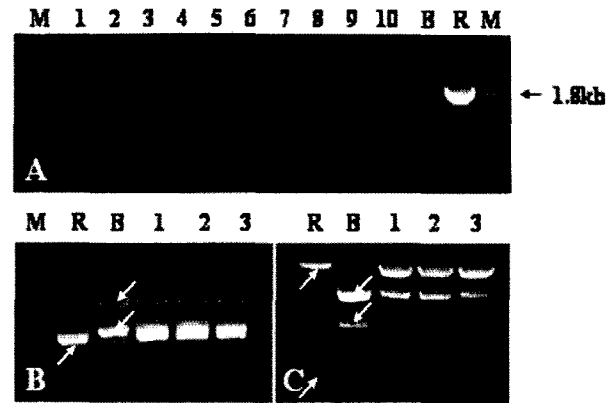


Figure 2. PCR analysis of putative fusion plants (1~10). A: Screening by NWB-CMS specific primers; B: UBC 834 primers; C: UBC 853 primers (M: size maker; R: *R. sativus* positive control; B: *B. oleracea* positive control).

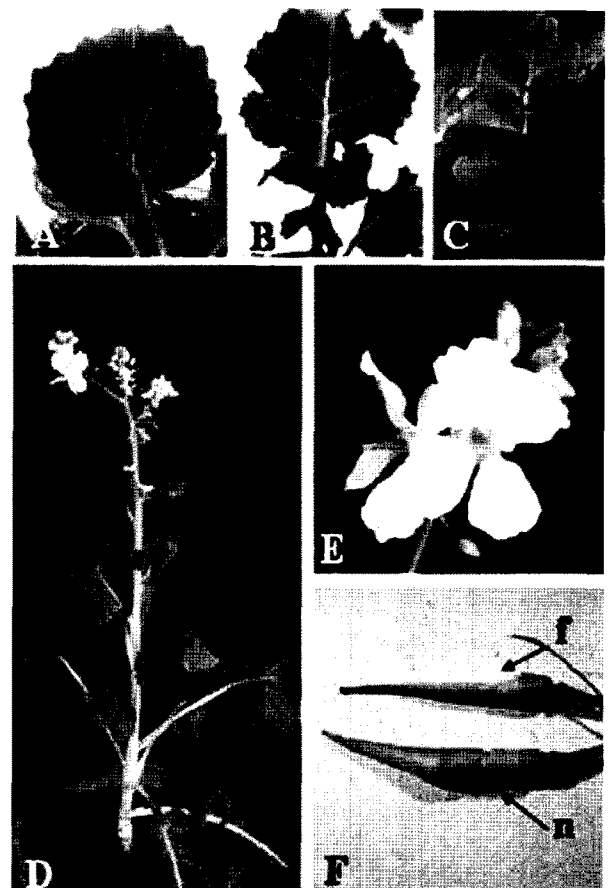


Figure 3. Comparisons of the phenotype between fusion plant and source plants. A: cabbage leaf; B: fusion plantlet leaf; C: radish leaf; D~E: flower morphology of fusion plant; F: immature pod of fusion plant after backcrossing to cabbage and normal cabbage (f: fusion plant; n: normal cabbage).

도하였다. 일반적인 양배추의 화색은 노란색인데 반해 세포 융합체의 화색은 흰색으로 전형적인 무의 꽃색과 같았으며 형태적으로도 무의 꽃과 상당히 유사한 형태를 취하고 있었

다 (Fig. 3D, E). 이들 3개의 융합체 모두 매우 소량의 화분이 생성되었고 실험에 사용하였던 원재료 양배추의 화분을 이용하여 역교배를 실시하였으나 2개의 개체에서는 종자 채종이 불가능하였고 나머지 1개체에서 3개의 종자를 얻을 수 있었다. 그러나 종자 형성이 가능하였던 1개체에서도 단지 3개의 꼬투리에서 각각 1개의 종자가 결실되었을 뿐 (Fig. 3F) 대부분의 꼬투리 (pod)에서는 종자 결실에 실패하여 빈 상태인 것이 확인되었다. 이와 같은 결과는 유체와 서래풀의 중간 잡종의 결과에서 종자의 결실이 매우 어렵고 역교배를 통해 일부 종자를 얻었다는 결과와 유사하였다 (Hu et al., 2002).

본 실험에서는 양배추와 무의 원형질 분리 조건을 확립하였고, 분리된 원형질체를 화학적 융합 방법을 통하여 동형 융합에 의한 핵이 융합된 형태의 융합체를 획득하였다. 그러나 마커 분석 결과 무의 세포질 융성불임인자가 양배추로 전이가 되지 않았고 결실을 맺은 융합체 역시 자가수분이 불안정한 이질배수체로 추정되며 따라서 양배추 육종의 목적에 사용이 적절치 않았다. 본 연구는 현재 진행중인 무의 융성 불임 형질을 나타내는 미토콘드리아를 선택적으로 양배추에 도입할 수 있는 이종간의 비대칭 융합 시스템의 구축과 비대칭 원형질 융합체의 재분화가 필요함을 제안하는 기초 자료로 사려된다.

적 요

양배추와 무로부터 원형질체를 분리하였고 PEG 처리를 통하여 융합을 하였다. 고농도의 원형질체 혼합물로부터 많은 미소괴를 관찰할 수 있었다. 미소괴는 정상적인 캘러스로 자랐고 이들 캘러스로부터 총 218개의 신초가 재분화되었다. 재분화된 개체는 순화 과정을 거쳐 온실에서 재배하였다. 순화된 208개체를 대상으로 마커 검정을 통하여 융합 여부를 확인한 결과, 모두 무의 NWB-CMS에 특이적인 PCR 산물을 확인할 수 없었다. 그러나 ISSR 분석을 통하여 208개체 중 3개체에서 양배추와 무의 세포가 융합됨을 확인하였다. 이를 통하여 원형질체의 융합이 성공적으로 일어났음을 증명할 수 있었다. 세포융합이 일어난 3개체는 모두 양배추와 무의 형질을 보이는 중간적인 형태를 가지고 있었다. 이들은 춘화처리를 거쳐 모두 개화 되었으나 꽃의 색깔이 무의 형질과 같은 흰색이었고 이중 한 개체에서만 역교배를 통하여 3개의 종자를 얻었다.

사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 (506019-03-1-CG000)의 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Brown GG, Formanova N, Jin H, Wargachuk R, Dendy C, Patil P, Laforest M, Zhang J, Cheung WY, Landry BS (2003) The radish Rfo restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *The Plant Journal* 35: 262-272
- Cardi T, Earle ED (1997) Production of new CMS *Brassica oleracea* by transfer of 'Anand' cytoplasm from *B. rapa* through protoplast fusion. *Theo Appl Genet* 94: 204-212
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A simple and rapid methods for plant DNA preparation. Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1: 19-21
- Frearson EM, Power JB, Cocking EC (1976) The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol* 33: 130-137
- Handa H, Gualberto JM, Grienenberger JM (1995) Characterization of the mitochondrial orfB gene and its derivative, orf224, a chimeric open reading frame specific to one mitochondrial genome of the "Polima" male-sterile cytoplasm in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Curr Genet* 28: 546-552
- Hu Q, Hansen L, Laursen J, Dixelius C, Andersen S (2002) Intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding. *Theor Appl Genet* 105: 834-840
- Keller WA, Melchers G (1973) The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z Naturforsch* 28: 734-741
- Kim DH, Kang JG, Kim BD (2007) Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility-associated orf456 gene of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Mol Bio* 63: 529-532
- L'Homme Y, Brown GG (1993) Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile *Brassica* mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus. *Nucleic Acids Res* 25: 1903-1909
- Lian YJ, Lim HT 2001. Production and Characterizations of Somatic Hybrids between *Brassica campestris* L. ssp *pekinensis* and *Brassica oleracea* L. var *capitata*. *J Plant biotechnology* 3: 33-38
- Murayama S, Habuchi T, Yamagishi H, Terachi T (2003) Identification of a sequence-tagged site (STS) marker linked to a restorer gene for *Ogura* cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.) by non-radioactive

- AFLP analysis. *Euphytica* 129: 61-68
- Nahm SH, Lee HJ, Lee SW, Joo GY, Harn CH, Yang SG, Min BW (2005) Development of a molecular marker specific to a novel CMS line in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theo Appl Genet* 111: 1191-1200
- Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rousselle, Renard M (1983) Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 191: 244-250
- Singh M, Hamel N, Menassa R, Li XQ, Young B, Jean M, Landry BS, Brown GG (1996) Nuclear genes associated with a single Brassica CMS restorer locus influence transcripts of three different mitochondrial gene regions. *Genetics* 143: 505-516
- Walters TW, Mutschler MA, Earle ED (1992) Protoplast fusion -derived Ogura male-sterile cauliflower with cold tolerance. *Plant Cell Rep* 10: 624-628
- Yamanaka H, Kuginuki Y, Kanno T, Nishio T (1992) Efficient production of somatic hybrids between *Raphanus sativus* and *Brassica oleracea*. *Japanese J. of Breeding* 42: 329-339

(접수일자 2008년 3월 14일, 수리일자 2008년 6월 24일)