

배추 원형질체 배양에 미치는 다양한 처리의 효과와 원형질체 유래 캘러스로부터 신초 재분화

한중술^{1*}, 윤무경¹, 정미혜²

¹농촌진흥청 원예연구소, ²농촌진흥청 농업과학기술원

Effects of a variety of treatments affecting Chinese cabbage protoplast culture, and plant regeneration from protoplast-derived callus

Jeung-Sul Han^{1*}, Moo-Kyeong Yoon¹, and Mihye Jeong²

¹National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

²National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT Here we describe a procedure for Chinese cabbage protoplast culture and effects of various treatments. Chinese cabbage protoplasts were isolated from different parts of young seedlings as using an enzyme mixture, of which yield was maximized in seven hours around after digestion. The highest rate of initial cell division followed by micro-callus formation was obtained in the medium with 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L NAA, and 1.0 mg/L BA when the cotyledon-derived protoplasts were cultured. Initiation of cell division and micro-callus proliferation significantly depended upon Chinese cabbage genotype under a same culture circumstances. The micro-calli developed from cotyledon tissue of Norang-Bom cultivar successfully grew toward callus colonies on the solidified medium with 0.2 mg/L zeatin and 0.1 mM spermidine. The callus colonies generated de novo shoots at the maximum frequency of 4.3% on the medium with 5.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA. Our results might be helpful for further studies to enhance the regeneration efficiency in Chinese cabbage protoplast culture.

서 론

다른 식물 종이 보유하고 있는 유용한 특성을 전통육종 프로그램에서 활용하기 위해서는 중간 교배 후 배배양을 수행함으로써 잡종 식물체를 얻거나 두 종의 원형질체를 융합하여 체세포잡종 식물체를 획득한 후 육종 소재로 활용하는 방안을 고려할 수 있다. 원형질체 융합을 통해 얻어진 식물체는 교배를 통해 얻어진 중간잡종 식물체와는 달리 양 종의 핵 내 유전자뿐 아니라 미토콘드리아나 엽록체 게놈이

가지고 있는 유용 유전자를 함께 가질 기회가 있다는 장점이 있다 (Ren et al. 2000). 미토콘드리아와 같은 세포소기관 게놈에 의해 유전되는 세포질용성불임성 (CMS)은 영양기관이 수확 대상인 작목에 있어 육종, 채종 및 품종보호를 위한 매력적인 특성으로 인식되어 왔으며 이를 활용코자 많은 노력이 이루어져 왔다. 특히, 야생 무 (*Raphanus sativus*)에서 발견된 Ogura CMS (Ogura 1968)는 배추과에서 발견된 다른 CMS에 비해 상대적으로 환경에 안정적이며, *Brassica*의 세포질로 이입되었을 때 용성불임성을 회복시킬 수 있는 *Brassica*의 핵 내 회복유전자가 아직까지 발견되고 있지 않아 육종프로그램을 단순화시키는 것도 가능하다. Ogura

*Corresponding author Tel 031-290-6196 Fax 031-290-6219
E-mail: harnjs@rda.go.kr

CMS는 Bannerot 등 (1974)에 의해 *Ogura* 세포질을 갖는 무 (*Ogu RR*)와 가임 유채 (*AC AACC*)간의 교배를 통한 반수체 (*Ogu RAC*) 획득, 염색체 배가 (*Ogu RRAACC*) 및 가임 유채를 반복친으로 한 연속적 여교배 과정을 거쳐 *Ogura* 세포질을 갖는 *Brassica napus* (*Ogu AACC*)가 육성되었으며, 그 후 이를 일회친으로 활용하여 가임 *B. rapa* (*A AA*)를 역시 반복적으로 여교배함으로써 *Ogura* 세포질을 갖는 *B. rapa* (*Ogu AA*)가 육성되었다 (Heyn 1978; Williams and Heyn 1981). 이렇게 얻어진 *Ogura* CMS 배추는 웅성불임은 발현하지만 불행하게도 밀선탄달이 불량하거나 황화현상이 나타난다 (Fig. 3A). 교배를 통해 육성된 *Ogura* CMS 배추의 이러한 불량 표현형은 육종가의 부단한 종내 교배 및 선발 노력에도 불구하고 도태되지 않아 *Brassica*속에서는 무의 *Ogura* CMS를 실용화 하는 것이 불가능한 것으로 받아들여져 왔다. 그러나 최근에서야 원형질체 융합을 통해 세포소기관 계놈을 재구성 할 수 있게 됨으로써 그 원인이 무의 세포질 소기관과 배추 핵의 분자생리적 불화합에 기인한다는 것이 밝혀졌다.

언급한 고전적 육종프로그램에 답을 제공하고 *Brassica* 핵과 친화성을 갖도록 *Ogura* 세포질의 소기관 계놈을 재구성할 수 있는 아직까지의 유일한 방법은 원형질체 융합 기술의 적용일 것이다. Pelletier 등 (1983) 이 후 원형질체 융합을 통해 웅성불임성을 발현하는 미토콘드리아 유전자와 제초제 triazine에 저항성을 나타내는 엽록체 유전자를 동시에 갖는 체세포잡종 *B. napus*가 합성 (Jourdan et al. 1989)된 이후 배추과 작물에 있어 새로운 육종 및 채종 체계의 수립이 가능하게 되었으며 현재 직접 상업적 품종개발로 이어지고 있다 (In et al. 2008). 그러나 배추과 작물의 성공적 원형질체 배양과 융합에 관한 다양한 보고 중 A 계놈을 갖는 배추 (*B. rapa*)의 단독 원형질체 배양 및 원형질체 유래 식물체 재분화에 관한 보고는 찾아보기 어렵다 (Han and Kim 1990). 대부분의 *Brassica* 원형질체 배양 및 융합에 관한 연구에서는 A 계놈에 비해 상대적으로 기내 재분화능이 우수한 것으로 알려진 *B. oleracea* (C 계놈)를 한 쪽 융합친으로 사용하여 합성 *napus*를 우선 획득하고 이를 교배모본 (bridge)으로 활용하여 핵치환 하는 방법을 선택하고 있다. 이 같은 방법을 사용할 경우 C 계놈을 제거하는 데 상당한 시간과 노력이 필요하며 C 계놈을 완전히 제거하는 것도 어렵다. 또한 이미 원형질체 융합 후 여교배를 통해 얻어진 유용 CMS 배추를 일회친으로 활용하여 여교배 함으로써 상업적 일대잡종 품종의 한 쪽 친을 웅성불임성화 하는 것도 역시 상당한 시

간이 소요된다. 따라서 A 계놈인 배추의 원형질체 (intact protoplast) 배양을 통한 기내 재분화 체계를 확립하고 다양한 배추과 작물의 *Ogura* CMS cytoplasm과의 비대칭 융합 (Sakai and Imamura 1990)에 이 체계를 적용할 수 있다면 효율적으로 일대잡종 품종의 웅성불임 친을 육성할 수 있을 것이다.

이러한 목표 달성을 위해 본 연구에서는 체계적으로 배추 원형질체 분리로부터 초기 세포분열 유도, micro-callus 형성, callus colony 생장, 그리고 callus colony로부터 신초 재분화 유도에 이르는 각 단계에 다양한 처리를 함으로써 그 효과에 대한 정보를 얻는 한편 배추 단독 원형질체로부터 얻어진 callus를 배양함으로써 재분화 신초 획득 효율을 향상시키고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

농촌진흥청 원예연구소에서 보유한 *Ogura* CMS 서울배추 (Fig. 3A), 가임 서울배추 내혼 계통, TuMV 저항성 원예 20021 내혼 계통 및 시판 일대잡종 4개 품종을 사용하였다. 배추 종자를 Han과 Kim (1990)의 방법에 따라 표면살균한 후 하배측 채취용은 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mM이 첨가되고 agar 1.5%로 굳힌 배지에, 떡잎 및 본잎 채취용은 sucrose 10 g/L가 첨가되고 agar 0.8%로 굳힌 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)에 각각 파종하였으며 배지의 pH는 고압멸균 전에 5.8로 조정하여 사용하였다. 파종한 종자는 16시간 명 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 8시간 암의 일장 하에서 25°C로 배양하여 발아시켰다.

원형질체 분리

발아한 배추 실생으로부터 파종 후 1주일에 하배측, 2주일에 떡잎 및 3주일에 본잎을 채취하여 세절한 후 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM과 mannitol 0.3 M이 첨가된 pH 5.8 용액에서 16시간 동안 암상태로 전처리 하였다. 전처리된 절편을 효소 조합을 달리한 NN69 무기염 (Nitsch and Nitsch 1969), sucrose 0.1 M, mannitol 0.7 M (하배측) 또는 0.3 M (떡잎과 본잎), MES (Sigma-Aldrich, USA) 10 mM, albumin bovine (Sigma-Aldrich, USA) 0.2%, pH 6.2 용액에 넣어 50 rpm으로 진탕하면서 27°C 암상태에서 최장 20시간까지 배양하였다.

효소는 효소액 A (cellulose R-10 1%; Yakult Honsha Co., Japan, macerozyme R-10 0.5%; Yakult Honsha Co., Japan)와 효소액 B (cellulose R-10 1%, macerozyme R-10 0.4%, pectolyase 0.1%; Sigma-Aldrich, USA)로 구분하여 사용하였다. 모든 용액은 pore size 0.2 μm membrane filter로 멸균후 사용하였으며, 처리당 5개 플라스크를 사용하여 매 시간마다 각 플라스크로부터 2개 표본을 취한 후 haemocytometer를 이용하여 현미경 하에서 분리된 원형질체의 수를 계산하였다. 효소처리가 완료된 현탁액은 250 μm 체로 거른 후 그 여과액에 NN69 무기염과 sucrose 0.6 M이 첨가된 pH 5.8 용액 등량을 혼합한 후, 혼합액을 15 mL conical tube에 담아 100 $\times\text{g}$ 에서 7분간 분획하였다. 원형질체가 포함된 상정액을 취하여 W5 용액 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 125 mM, NaCl 154 mM, KCl 5 mM, glucose 5 mM, pH 5.6) (Menczel and Wolfe 1984)으로 희석한 후 100 $\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리하는 방법으로 원형질체를 2회 세척하였다.

원형질체 배양과 micro-callus 생장

수세가 완료되어 tube에 침강한 원형질체 pellet은 glucose 0.1 M, mannitol 0.3 M, coconut water (Sigma-Aldrich, USA) 10 mL/L 및 식물생장조절제 (PGR) 조성을 달리한 4종의 B5 배지 (Gamborg et al. 1968)를 이용하여 5×10^4 개/mL로 희석한 후 60 \times 10 mm petri-dish에 3 mL씩을 분주하였다. 배양물은 연속 암배양 하거나 처음 3일간 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 암배양한 후 25 $^{\circ}\text{C}$, 16시간 명 ($12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)/8시간 암 조건으로 이동하였다. 원형질체 배양 시작 7일 후 6개 배추 인자형 (노랑봄, 조생추석, 향풍, 국보65일, 서울, 원예20021호)에 대한 각각의 처리별 세포분열율을 조사하는 한편, PGR 조성이 동일한 8p-KM 수정배지를 각 배양물에 3 mL씩 첨가하였다. 8p-KM 수정 기본배지는 KM배지 (Kao and Michayluk 1975)에 glucose와 sucrose를 각각 50 mM, mannitol 0.1 M, mannose, fructose, ribose, xylose, rhamnose, cellobiose를 각각 250 mg/L, casamino acid 250 mg/L 및 coconut water 10 mL/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조정하여 조제하였다. 원형질체배양 시작 14일 후 6개 배추 인자형에 대한 micro-callus 생장을 처리별로 조사하고 동일한 성장조절제 조성의 MS 수정배지 (MS 배지, sucrose 50 mM, mannitol 50 mM, PVP K40 500 mg/L, pH 5.8)를 6 mL씩 추가 첨가하였다. MS 수정배지 추가 첨가 직 후 배양물을 약 3 mL씩 균일하게 4등분하여

새로운 60 \times 10 mm petri-dish로 옮겨 배양하였다. Petri-dish는 매일 2회씩 가볍게 흔들어 줌으로써 배양물이 petri-dish 바닥에 부착하는 것을 방지하였다. 모든 수정 배양액 조성은 Jee와 Chung (1989a; 1989b; 1989c)의 보고를 참고하였다.

Callus colony 생장과 재분화 유도

원형질체 배양 시작 17일 후 노랑봄, 조생추석 및 서울배추의 micro-callus가 포함된 배양물 3 mL를 균일하게 취하여 삼투압을 낮추고 다양한 첨가물이 포함된 11종의 수정 MS 배지 (MS배지, sucrose 37.5 mM, mannitol 112.5 mM, agarose type VII 12.5 g/L, pH 5.8)가 담긴 87 \times 15 mm petri-dish에 plating하였다. 배양물은 16시간 명 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)/8시간 암의 일장 하에서 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 배양하였다. Micro-callus를 plating한 2주 후 callus colony의 생장을 조사하였으며 노랑봄배추 callus colony는 유래한 종류별로 구분하여 재분화 유도를 위한 재료로 사용하였다. PGR (BA, zeatin, NAA)이 혼용 첨가되고 sucrose 30 g/L과 gelrite 2 g/L가 첨가된 pH 5.8 MS배지를 재분화 유도를 위한 배지로 사용하였으며, petri-dish 당 6-10개의 callus colony를 이식하였고 배양환경은 callus colony 유도 시와 동일하였다. 신초와 뿌리 분화는 배양 3주 후 조사하였다.

결과 및 고찰

기내 파종 배추 실생으로부터 원형질체 분리를 위한 조직별 효소처리 시간

식물 원형질체 분리에 가장 큰 영향을 미치는 것은 사용되는 효소의 종류, 농도 및 처리시간일 것이며 (In et al. 2008; Jee and Chung 1989a), 식물 조직의 종류에 따라 단위 무게 또는 부피 당 세포의 수가 다르다는 것은 일반적 사실이다. 본 연구에서는 Ogura CMS 서울배추 기내 실생의 하배축, 떡잎 및 본잎을 재료로 이용하여 2가지 효소액 처리 후 각 조직의 단위 무게당 분리되는 원형질체 수를 효소처리 20시간 까지 조사하였다 (Figure 1). 본잎 조직의 경우 효소액 A (cellulose R-10 1%, macerozyme R-10 0.5%) 처리 1시간 이후 급속하게 원형질체가 분리되고, 약 5시간 이후부터는 분리되는 원형질체의 수가 크게 증가하지 않았다. 떡잎 조직은 효소액 A 처리 이후 약 7시간까지 분리되는 원형

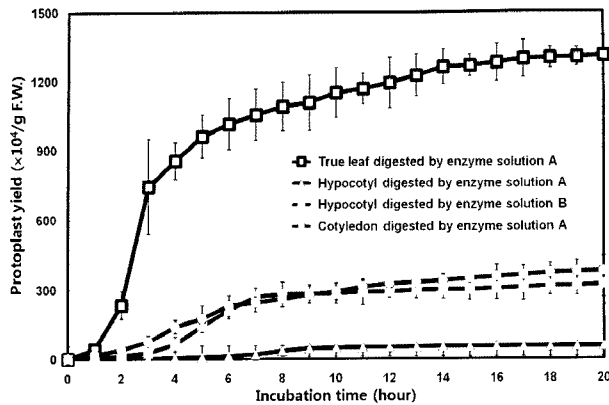


Figure 1. Time curves of protoplast yield depending on tissue types of Chinese cabbage and enzyme combination. Enzyme solution A contained 1% cellulose R-10 and 0.5% macerozyme R-10, and enzyme solution B contained 1% cellulose R-10, 0.4% macerozyme R-10, and pectolyase 0.1%. The data represent the mean values of ten replicates. Each bar on the curves represents the standard deviations.

질체 (Figure 3Ba)의 수가 완만하게 증가되었고 그 이후 원형질체 수는 정체하였다. 한편, 하배축 조직은 효소액 A 처리 시 원형질체의 수율이 현저히 낮아, pectin질 분해 효소의 구성을 조절하였다. 조절한 효소액 (효소액 B; cellulose R-10 1%, macerozyme R-10 0.4%, pectolyase 0.1%)으로 하배축 절편을 처리한 결과 떡잎 조직에 효소액 A를 사용했을 때와 유사한 정도로 원형질체가 분리되었다. 재분화 배양을 위한 식물 원형질체 분리 시 Jee와 Chung (1989a)의 경우 (2-3 시간)를 제외하고 대부분 약 10-16 시간 동안 또는 overnight하여 효소액을 처리하였다 (Sakai and Imamura 1990; Lian and Lim 2001; In et al. 2008). 본 실험의 결과 분리되는 원형질체의 수는 효소액 처리시간에 따라 정의 상관관계를 나타내지 않으므로 cellulase나 pectinase와 같은 효소에 의해 조기에 분리된 원형질체가 피해를 입을 것을 최소화 하기 위해서는 적정 시간 동안만 처리하는 것이 필수적이라고 판단된다. 이와 같은 결과를 토대로 배추 본잎의 경우 효소액 A로 5시간 처리, 떡잎의 경우 효소액 A로 7시간 처리, 하배축의 경우 효소액 B로 7시간 처리하는 것을 고수율 원형질체 분리를 위한 효소액 조성 및 처리시간으로 설정하고 다음 실험에 활용하였다.

배추 원형질체로부터 세포분열 유도 및 micro-callus 성장

일반적으로 cytokinin은 세포분열을 유도할 수 있으며 auxin과 혼용되었을 때 특히 효과적이라는 점과, 세포분열을 지속시켜 callus 성장을 유도하기 위해 공급하는 외생 식물

생장조절제 (PGR)의 효과는 PGR의 종류와 농도뿐 아니라 내생 auxin과 cytokinin의 비율에 크게 의존한다는 점은 잘 알려진 사실이다 (Pierik 1987). 배추과 식물에서 원형질체 배양 시 세포분열을 유도하고 micro-callus로 성장을 지속시키기 위해 2,4-D, NAA, BA, kinetin 등의 PGR을 적절히 혼용하여 사용하였다 (Jee and Chung 1989b; Han and Kim 1990; Kirti et al. 1995; Lian and Lim 2001; In et al. 2008). 본 실험에서도 가임 서울배추 내혼 계통 실생의 떡잎, 하배축 및 본잎으로부터 분리한 원형질체를 2,4-D, NAA 및 BA 등의 조성이 다른 4종류의 액체 배지에서 언급한 바와 같이 광조건을 하면서 배양 (명배양)한 후 세포분열율과 micro-callus 성장을 조사하였다 (Table 1). 세포분열율과 micro-callus 성장 모두 2,4-D 1.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L 및 BA 1.0 mg/L가 첨가된 배지에서 떡잎 유래 원형질체를 배양했을 때 각각 33.4%와 8.5 score로 가장 높았다. Han과 Kim (1990) 및 Lian과 Lim (2001)은 배추 원형질체를 단독 배양하거나 융합친으로 활용하기 위해 원형질체를 분리할 때 본잎을 재료로 이용하는 것이 그 수율이 높을지라도 초기 세포분열과 이어지는 micro-callus 성장을 위해서는 떡잎을 재료로 하는 것이 보다 효과적이며, 초기 세포분열율이 높다고 하더라도 이것이 다음 단계인 micro-callus 성장으로 반드시 이어지지 않는다는 것을 나타낸다고 할 수 있다. 또한 인자처리의 강도 (ω^2)를 분석한 결과 예측한 바와 같이 세포분열 및 micro-callus 성장 모두에 PGR의 영향이 약 66%로 가장 크고 다음으로 절편의 종류에 따른 영향이 각각 13%와 15%였다. 따라서 배추 원형질체 배양 시 초기 세포분열 유도와 지속적 micro-callus로의 성장을 위해서는 배지의 조성, 특히 PGR을 조절하는 것이 효과적이라고 할 수 있다.

식물 기내 배양에 있어 다양한 배양 환경 중 광조건은 기내 형태 형성에 영향을 미치며 (Leshem et al. 1995; Curuk et al. 2003) 식물 재료의 인자형 (genotype)이 재분화의 성패를 좌우한다는 많은 보고가 있다 (Jain et al. 1988). 본 실험에서는 가임 서울배추를 포함한 2개 내혼 계통과 노랑봄배추 등 시판 일대잡종 4품종의 떡잎에서 분리한 원형질체를 2,4-D 1.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L 및 BA 1.0 mg/L가 첨가된 배지에 현탁하고 광조건을 달리하여 배양한 후 세포분열율과 micro-callus 성장을 조사하였다 (Figure 2). 배추의 인자형과 광조건에 따라 세포분열율과 micro-callus 성장 양상이 달리 나타났는데, 가임 서울배추의 원형질체를 명배양 하였을 때 세포분열율이 33.4%로 가장 양호하였으며, micro-callus 생장은 노랑봄,

Table 1. Effects of PGRs on cell division and further micro-callus proliferation of protoplasts derived from different types of tissue in Chinese cabbage cultivar Seoul. The data represent the mean values of eight replicates. Values in a column within the same row followed by a common letter are significantly different as being marked by F-value test (Duncan's multiple range test). Strength of association (omega-square; ω^2) indicates the strengths of factors impacting the values

Plant growth regulator	Explant	Cell division		Micro-callus proliferation	
		Rate (%) ^a	(F-value test)	Score ^b	(F-value test)
Free	Cotyledon	0.5	ns	0.0	ns
	Hypocotyl	0.3		0.0	
	True leaf	0.0		0.0	
0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA	Cotyledon	5.3 c	***	3.5 a	**
	Hypocotyl	16.9 a		2.3 b	
	True leaf	11.5 b		1.3 b	
1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA	Cotyledon	33.4 a	***	8.5 a	***
	Hypocotyl	20.2 b		7.0 b	
	True leaf	13.9 c		2.7 c	
3.0 mg/L 2,4-D	Cotyledon	10.1 c	***	3.5 a	***
	Hypocotyl	22.6 a		1.7 b	
	True leaf	18.7 b		1.2 b	
Strength of association (ω^2)		Explant, 0.13; PGR, 0.66; Explant*PGR 0.05		Explant, 0.15; PGR, 0.66; Explant*PGR, 0.11	

^a Number of dividing-cells / Number of observed cells

^b Rank of micro-callus initiation and its growth ranging from 0 (no) to 9 (very abundant).

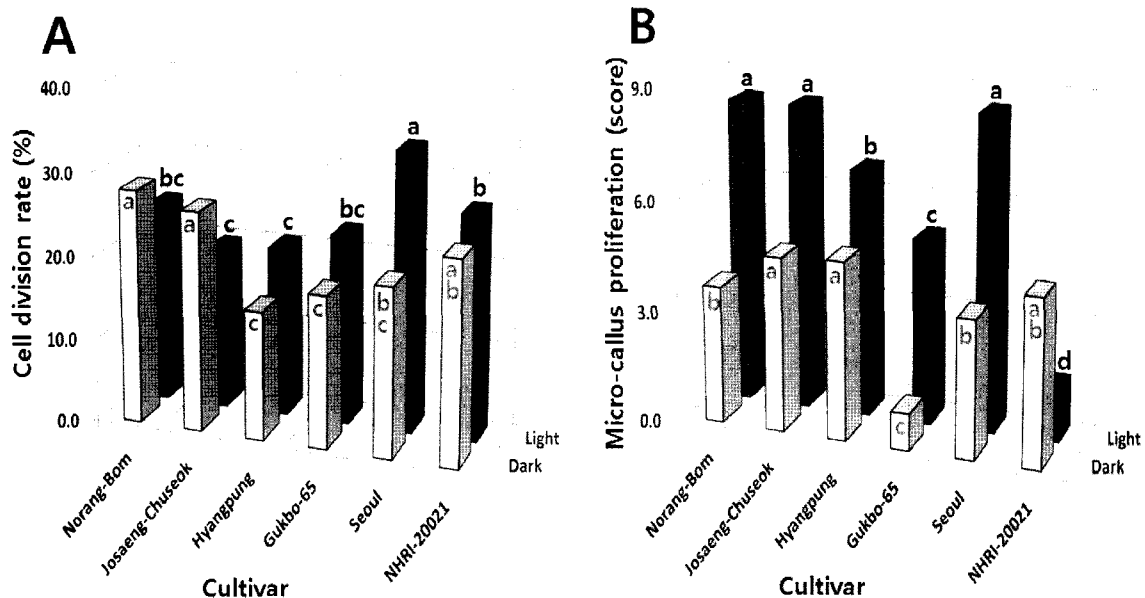


Figure 2. Effects of genotype and light on cell division and further micro-callus proliferation of Chinese cabbage protoplasts isolated from cotyledon tissue. Protoplasts were cultured in a liquid medium with 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L NAA, and 1.0 mg/L BA. Scores in B frame indicate the micro-callus proliferation ranks ranging from 0 (no) to 9 (very abundant). The data represent the mean values of six replicates. Values in a column within the same row followed by a common letter are significantly different at the 5% level (Duncan's multiple range test).

조생추석 및 서울배추를 명배양 했을 때 각각 8.3, 8.3 및 8.5 score로 왕성하다는 것을 관찰할 수 있었다. 이들 3개 품종의 떡잎 유래 원형질체를 명배양 함으로써 성장한 micro-callus는

다음 실험인 고체 배지에 plating하여 callus colony를 획득하기 위한 재료로 사용하였다.

배추 원형질체 유래 callus colony 획득과 재분화 유도

배추 3개 인자형으로부터 얻어진 micro-callus 현탁액 3 mL를 취하여 BA, zeatin, NAA 등 PGR과 ethylene생합성 경로와 밀접한 관계를 가지고 있는 polyamine 및 ethylene 생합성 억제제의 하나인 AVG 등을 달리 첨가한 11종의 고체배지에 plating 한 후 callus colony의 성장을 조사하였다 (Table 2). 노랑봄 품종은 code D 배지 (BA 2.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L, spermine 0.1 mM), H 배지 (zeatin 0.2 mg/L) 및 I 배지 (zeatin 0.2 mg/L, spermidine 0.1 mM) (Figure 3Bb)에서 양호하게 callus colony가 형성된 반면, 조생추석 품종과 서울배추는 code H 배지와 I 배지에서 노랑봄 품종에 미치지 못하는 callus colony가 양호하게 형성되었다. Ethylene은 식물 기내 재분화에 대해 경우에 따라 긍정적이거나 부정적 영향을 동시에 갖고 있으며 (Huxter et al. 1981; Kumar et al. 1987; Songstad et al. 1988; Chi et al. 1991), 기내 재분화가 어려운 *Brassica*속에서는 ethylene의 생합성 또는 작용을 억제함으로써 재분화를 성공적으로 유도할 수 있다고 보고되었다 (Pua 1993). 본 시험에서는 ethylene 생합성 주변 경로와 연결되어 있으며 일종의 PGR로 인식되는 polyamine류 및 ACC 합성효소의 활성을 저해함으로써 ethylene 생합성을 직접 억제하는 AVG를 callus colony 성장배지에 첨가하였으나 효과가 없거나 고농도에서 callus colony의 생장이 억제되는 경향을 나타내었다. 그러나 본 연구의 다음 실험에서와 같이 callus colony로부터 신초 재분화를 유도하는 단계에서 다량의 cytokinin을 배지에 첨가하였음에도 불구하고 ethylene 억제제의 효과를 검토하지 않았다 (Table 3). 실제로

cytokinin류는 몇몇 종에서 ACC 합성효소의 활성을 증대시킴으로써 ethylene 생산을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Saha et al. 2007).

노랑봄 품종의 callus colony를 대상으로 유래한 배지 code 별로 구분한 후 (See the medium codes in table 2) BA, zeatin 및 NAA가 단용 또는 혼용 첨가된 MS배지에 치상하여 callus colony의 반응을 조사하였다 (Table 3, Figure 3Bc). Code D 배지에서 유래한 callus colony는 callus의 지속과 약간의 갈변현상만 관찰되었을 뿐 신초 또는 뿌리 재분화는 관찰할 수 없었다 (Figure 3Bc lower dishes). Code H 배지에서 유래한 callus colony는 BA 2.0 mg/L와 NAA 1.0 mg/L 첨가배지에서 2.9%와 22.7%의 빈도로 각각 신초와 뿌리가 재분화되었고 다른 배지에서는 callus 성장만 지속되었다. Code I 배지에서 생장한 colony는 BA 2.0 mg/L와 NAA 1.0 mg/L 첨가배지에서 1.4% 빈도로, BA 5.0 mg/L와 NAA 1.0 mg/L 첨가배지에서는 4.3%의 빈도로 각각 신초가 재분화 (Figure 3Bf, g)되었으며, 각각의 배지에서 뿌리 재분화 (Figure 3Bd, e) 빈도는 22.7%와 11.7%였다.

Callus source에 따른 이러한 반응의 차이는 callus가 어떠한 배양 환경을 거쳐 성장되어 왔는가 즉, callus 유도 과정 중의 배양환경이 callus의 속성에 영향을 미침으로써 최종적 재분화 효율에도 역시 영향을 미친다는 것을 시사한다고 할 수 있다. 따라서 배추 원형질체 배양 시 원형질체로부터 신초유기용 재료로 사용될 callus 형성까지 각 단계의 배양환경을 신초 분화에 유리한 방향으로 주의 깊게 조절하여야 할 것으로 판단된다. 재분화된 신초는 PGR 무첨가 MS배지에 계대배양함으로써 양호하게 뿌리를 발생시킬 수 있었으

Table 2. Effects of PGR and ethylene-related substances on callus colony formation from micro-callus suspension derived from Chinese cabbage protoplast culture

Medium code	PGR (mg/L)			Polyamine (mM)		AVG (μ M)	Cultivar		
	BA	zeatin	NAA	spermidine	spermine		Norang-Bom	Josaeng-Chuseok	Seoul
A	-	-	-	-	-	-	- ^a	-	-
B	2.0	-	1.0	-	-	-	+	-	+
C	2.0	-	1.0	-	-	5.0	+	-	-
D	2.0	-	1.0	-	0.1	-	+++	-	+
E	2.0	-	1.0	-	0.5	-	-	-	-
F	2.0	-	1.0	-	1.0	-	-	-	-
G	2.0	-	1.0	-	2.0	-	-	-	-
H	-	0.2	-	-	-	-	++++	++	+++
I	-	0.2	-	0.1	-	-	++++	++	+++
J	-	0.2	-	1.0	-	-	-	-	-
K	-	0.2	-	2.0	-	-	-	-	-

^a Levels of callus colony formation: -, non; +, poor; ++, moderate; +++, abundant; +++++, very abundant.

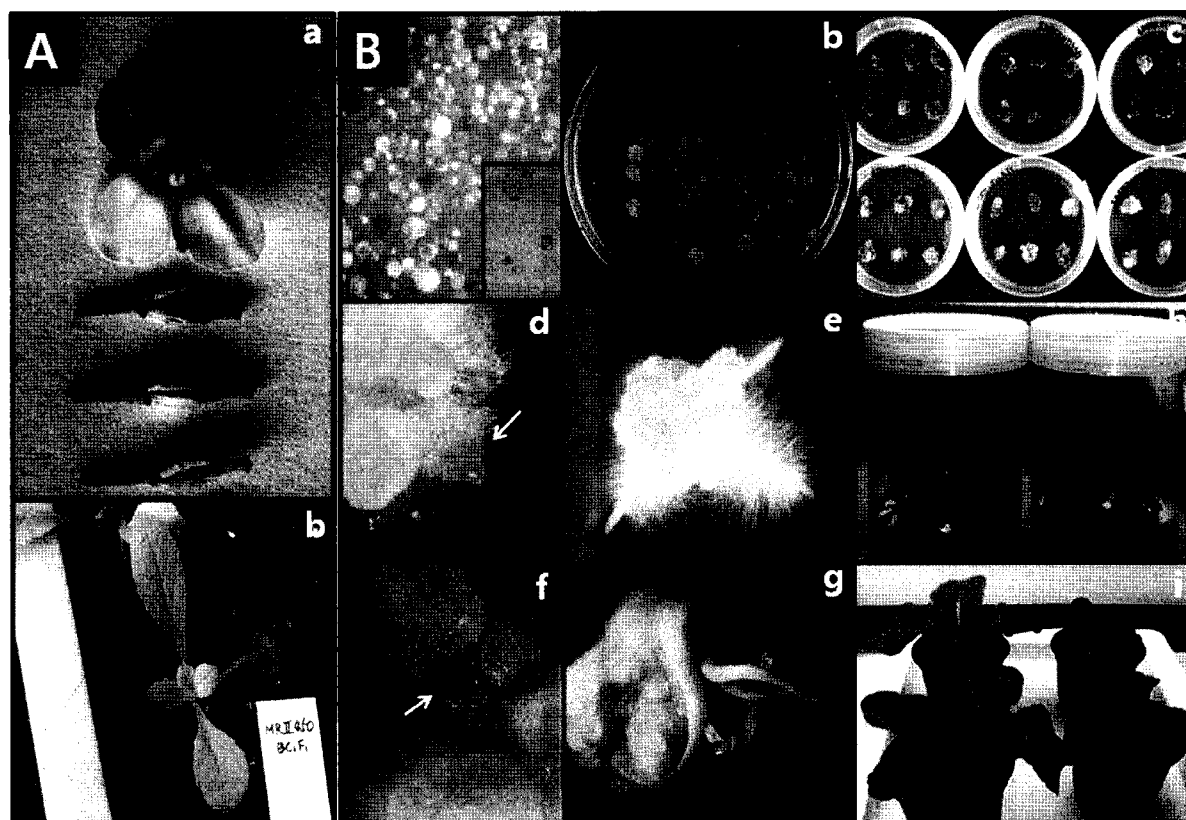


Figure 3. Phenotype of Ogura CMS and plant regeneration through protoplast culture in Chinese cabbage. A: a, male sterile flower and filaments with no pollens in an Ogura CMS inbred line, Seoul; b, chlorosis in young leaves of *Ogu* Seoul. B: a, protoplasts isolated from cotyledon tissue followed by fluorescein diacetate (FDA) treatment for a viability test (Bengoechea and Dodds 1986). More than 90% of protoplasts were viable, and the inset shows protoplasts in an enzyme solution before FDA treatment; b, callus colonies arising from micro-calli derived from cotyledon tissues of Norang-Bom cultivar; c, calli growing in a shoot induction media; d and e, root primordium initiation (arrow) and its growth respectively; f and g, shoot primordium initiation (arrow) and its growth respectively; h, root induction from the regenerated shoots on a PGR-free MS medium; i, acclimatized Chinese cabbage regenerants.

Table 3. PGR effects on shoot and root regeneration from callus colony derived from protoplasts of Chinese cabbage cultivar Norang-Bom. The data represent the mean values of seven replicates (six to ten callus colony per petri-dish). Values in a column followed by a common letter are significantly different at the 5% level (Duncan's multiple range test)

Callus colony source	PGR (mg/L)			Shoot regeneration (%)	Root regeneration (%)
	BA	zeatin	NAA		
D	2.0	-	1.0	0.0 b	0.0 c
	5.0	-	1.0	0.0 b	0.0 c
	-	1.0	-	0.0 b	0.0 c
	-	5.0	-	0.0 b	0.0 c
H	2.0	-	1.0	2.9 ab	22.7 a
	5.0	-	1.0	0.0 b	7.2 c
	-	1.0	-	0.0 b	0.0 c
	-	5.0	-	0.0 b	0.0 c
I	2.0	-	1.0	1.4 b	22.7 a
	5.0	-	1.0	4.3 a	11.7 b
	-	1.0	-	0.0 b	0.0 c
	-	5.0	-	0.0 b	0.0 c

며 (Figure 3Bh), 완전히 발근한 재분화 개체는 기내에서 감습 조절함으로써 순화시켰고 기외 이식 후 정상 식물체로 성장하였다 (Figure 3Bi).

배추가 속해 있는 *B. rapa* 종은 원형질체 배양뿐 만 아니라 각 기관의 절편 배양으로부터도 식물체 재분화가 상당히 어려운 것으로 알려져 있다 (Murata and Orton 1987; Jain et al. 1988; Narasimhulu and Chopra 1988; Ren et al. 2000). 본 연구에서 얻어진 최고 4.3% 빈도의 배추 단독 원형질체 배양을 통한 식물체 재분화 결과는 본 연구의 최종 목적인 융성불임 세포질잡종 (cybrid) 획득을 위한 원형질체 융합 연구에 적용하기에는 충분하지 않은 빈도일 수 있다. 그러나 본 연구의 결과는 과거 보고된 배추 단독 원형질체 배양을 통한 재분화 효율에 비하면 상당히 개선된 결과이며 다량의 callus colony를 비교적 손쉽게 획득할 수 있는 방법을 제시하였다는 측면에서 의미 있다고 사료된다. 본 연구에서 얻어진 callus colony를 재료로 보다 다양한 외생 PGR 조합 처리, ethylene 억제제의 사용 및 Murata와 Orton (1987)이 언급한 바와 같이 배지 내 당 조절 등을 검토한다면 보다 향상된 빈도로 배추 원형질체로부터 식물체를 재분화시킬 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구에서는 배추의 고수율 원형질체 분리 조건을 제시하는 한편 분리된 원형질체로부터 초기 세포분열 유도를 비롯하여 이어지는 micro-callus로의 성장, callus colony 획득 및 callus colony로부터 신초 재분화 과정에 미치는 다양한 처리의 효과를 구명하였다. 특히, 원형질체 배양 초기인 세포분열과 micro-callus 성장 단계에서부터 배추 인자형에 따라 차이가 있음을 입증하였으며, 최종적으로는 최고 4.3%의 빈도로 callus colony로부터 신초를 재분화 시켰다. 이러한 결과는 급후 배추 단독 원형질체 배양을 통한 고빈도 식물체 재분화 연구에 중요한 정보를 제공함으로써 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 배추 원형질체 배양에 있어 다양한 처리의 효과를 구명함으로써 배추 원형질체 배양을 통한 재분화 체계를 확립하고자 하였다. 배추 원형질체 분리 수율은 효소액, 사용된 조직 및 효소액 처리 시간에 따라 달리 나타났는데, 효소액 처리 약 7시간 이후부터는 분리되는 원형질체의 수가 크게 증가하지 않았다. 따라서 효소 자체에 의한 부정

적 영향을 고려하였을 때 최장 7시간 동안 효소처리를 하는 것이 적절한 것으로 판단하였다. 떡잎유래 원형질체를 2,4-D 1.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L 및 BA 1.0 mg/L 첨가 액체배지에서 배양하였을 때 초기 세포분열과 이어지는 micro-callus 생장이 가장 양호하였다. 다양한 배추 인자형에 대한 검토 결과 본 연구의 배양조건 하에서는 초기 세포분열과 micro-callus 생장이 배추 인자형에 따라 뚜렷하게 영향을 받는 것으로 나타났다. 노랑봄 품종의 떡잎에서 분리한 원형질체로부터 성장한 micro-callus 현탁액을 zeatin 0.2 mg/L의 spermidine 0.1 mM이 첨가된 반고체 MS 배지에 plating하였을 때 가장 왕성하게 callus colony가 형성 및 성장하였다. 이들 callus colony는 BA 5.0 mg/L 및 NAA 1.0 mg/L가 첨가된 배지에서 4.3%의 빈도로 재분화 신초가 유도되었다. 얻어진 신초는 PGR 무첨가 MS배지에서 손쉽게 발근하였고 발근된 식물체는 기외에서 정상 식물체로 성장하였다. 본 연구의 결과는 배추 단독 원형질체 배양을 통한 고빈도 식물체 재분화 연구에 중요한 정보를 제공함으로써 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

인용문헌

- Bannerot H, Boulidard L, Cauderon Y, Tempe J (1974) Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*. In: Proc EUCARPIA Meeting Cruciferae. Dundee. pp 52-54
- Bengochea T, Dodds JH (1986) Plant protoplasts: A biotechnological tool for plant improvement. Chapman and Hall. New York
- Chi GL, Pua EC, Goh CJ (1991) Role of ethylene on *de novo* shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (lour) Olsson *in vitro*. *Physiol Plantarum* 96: 178-183
- Curuk S, Ananthakrishnan G, Singer S, Xia X, Elamn C, Nestel D, Cetiner S, Gaba V (2003) Regeneration *in vitro* from the hypocotyls of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light. *HortScience* 38: 105-109
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158
- Han EJ, Kim HI (1990) Root & shoot regeneration from the protoplast of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis*. *Korean J Plant Tiss Cult* 17: 285-289
- Heyn FW (1978) Cytoplasmic genetic male sterility in *Brassica napus*. *EUCARPIA Cruciferae News* 1. 3: 34-35

- Huxter TJ, Thorpe TA, Reid DM (1981) Shooting initiation in light- and dark-grown tobacco callus: the role of ethylene. *Physiol Plantarum* 53: 319-326
- In DS, Song MJ, Jang IC, Min BW, Nahm SH, Shin JS, Lee SW, Harn CH (2008) Regeneration of symmetric protoplast fusion between cabbage (*Brassica oleracea* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.). *J Plant Biotechnol* 35: 121-126
- Jain RK, Chowdhury JB, Sharma DR, Friedt W (1988) Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassica* species. *Plant Cell Tiss Org Cult* 14: 197-206
- Jee SO, Chung JD (1989a) Protoplast culture of flower cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. forma *tricolor* Hort.), I. Factors affecting cell division in protoplast culture. *J Kor Soc Hort Sci* 30: 96-107
- Jee SO, Chung JD (1989b) Protoplast culture of flower cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. forma *tricolor* Hort.), II. Effect of plant growth regulators on plant regeneration. *Korean J Plant Tiss Cult* 16: 15-24
- Jee SO, Chung JD (1989c) Protoplast culture of flowering cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. forma *tricolor* Hort.), III. Plant regeneration from fused protoplasts. *Korean J Plant Tiss Cult* 16: 79-92
- Jourdan PS, Earle ED, Mutschler MA (1989) Synthesis of male-sterile, triazine-resistant *Brassica napus* by somatic hybridization between cytoplasmic male-sterile *B. oleracea* and atrazine-resistant *B. campestris*. *Theor Appl Genet* 78: 445-455
- Kao KN, Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105-110
- Kirti PB, Banga SS, Prakash S, Chopra VL (1995) Transfer of *Ogu* cytoplasmic male sterility to *Brassica juncea* and improvement of the male sterile line through somatic cell fusion. *Theor Appl Genet* 91: 517-521
- Kumar PP, Reid DM, Thorpe TA (1987) The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata* in vitro. *Physiol Plantarum* 69: 244-252
- Leshem B, Ronen R, Soudry E, Lurie S, Gepstein S (1995) Cytokinin and white light coact to enhance polypeptide metabolism and shoot regeneration in cultured melon cotyledons. *J Plant Physiol* 145: 291-295
- Lian YJ, Lim HT (2001) Production and characterization of somatic hybrids between *Brassica campestris* L. ssp *pekinensis* and *Brassica oleracea* L. var *capitata*. *J Plant Biotechnol* 3: 33-38
- Menczel L, Wolfe K (1984) High frequency of fusion induced in freely suspended protoplast mixtures by polyethylene glycol and dimethylsulfoxide at high pH. *Plant Cell Rep* 3: 196-198
- Murashige T, Skoog FA (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* 15: 473-497
- Murata M, Orton TJ (1987) Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica* species. *Plant Cell Tiss Org Cult* 11: 111-123
- Narasimhulu SB, Chopra VL (1988) Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of Brassicas. *Plant Cell Rep* 7: 104-106
- Nitch JP, Nitch C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87
- Ogura H (1968) Studies on the new male sterility in Japanese radish with special reference to utilization of this sterility toward the practical raising of hybrid seeds. *Mem Fac Agric. Kagoshima Univ.* 6: 39-78
- 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
- Pierik RLM (1987) In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Pua EC (1993) Cellular and molecular aspects of ethylene on plant morphogenesis of recalcitrant *Brassica* species in vitro. *Bot Bull Acad Sin* 34: 191-209
- Ren JP, Dickson MH, Earle ED (2000) Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *B. oleracea*. *Theor Appl Genet* 100: 810-819
- Saha S, Mori H, Hattori K (2007) Synergistic effect of kinetin and benzyl adenine plays a vital role in high frequency regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) in relation to ethylene production. *Breeding Sci* 57: 197-202
- Sakai T, Imamura J (1990) Intergeneric transfer of cytoplasmic male sterility between *Raphanus sativus* (cms line) and *Brassica napus* through cytoplasm-protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 80: 421-427
- Songstad DD, Duncan DR, Widholm JM (1988) Effect of 1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid, silver nitrate and non-bornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Rep* 7: 262-265
- Williams PH, Heyn FW (1981) The origins and development of cytoplasmic male sterile Chinese cabbage. In: Talekar NS, Griggs TD (eds), Chinese Cabbage, Asian Vegetable Research and Development Center, Tainan, pp 293-300