

배추 유전자원의 소포자 유래 배 발생 효율에 미치는 배양 조건 구명

서미숙 · 손성한 · 박범석 · 고호철 · 진민아

Efficiency of microspore embryogenesis in *Brassica rapa* using different genotypes and culture conditions

Mi-Suk Seo · Seong-Han Sohn · Beom-Seok Park · Ho-Cheol Ko · Mina Jin

Received: 25 March 2014 / Revised: 17 June 2014 / Accepted: 22 September 2014
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Total of fifty accessions of *Brassica rapa* with various morphological characteristics were used for production of double haploid plants through microspore culture in *Brassica rapa*. Among them, only 30 accessions induced embryos from microspores. The highest efficiency of embryo induction of 1.194 per bud was obtained from IT135449 of turnip type, while 3 accessions of sarson (winter oil) type did not generate embryo. The effect of heat shock periods for embryogenesis was also investigated with 4 accessions (IT135449; Turnip type, IT199710; Chinese cabbage type, IT212886; Pak choi type, IT218043; Summer oil type). The high productions of embryos were observed in IT135449, IT199710 and IT212886 when microspores were pre-cultured to 32°C for 2 days. In IT218043, high embryogenesis was observed at the 3 days of heat shock treatment. The optimal condition of shoot regeneration for IT199710 was observed in MS medium supplemented with NAA 0.5 mg·L⁻¹ and BAP 1 mg·L⁻¹. In contrast, the IT135449 and IT212886 were observed high regeneration frequency in MS medium without plant growth regulators. All the plantlets regenerated from microspore-derived embryos have been successfully transplanted to soil, and bud self-pollinated seeds were produced from

doubled haploid plants. This indicated that double-haploid genotype was likely generated naturally during embryogenesis process.

Keywords *Brassica rapa*, Microspore, Embryogenesis, Heat shock period, Regeneration

적 요

다양한 형태적 특징을 가진 배추 유전자원의 소포자 배양을 통한 고정계통의 육성 및 효율적인 소포자 배 발생 조건을 확립시키기 위하여 50종의 배추 유전자원을 대상으로 소포자 배양을 실시하여 30종에서 반수체배의 생산이 확인되었다. 소포자 배 발생률은 순무형인 IT135449에서 가장 높았고 일부 유지작물형(winter oil)에서는 배 발생이 관찰되지 않았다. 소포자 배양을 통한 다양한 배추 유전자원의 배 발생 효율의 증대를 위하여 유전자원 4종(IT135449, IT199710, IT212886, IT218043)을 대상으로 고온처리 기간에 따른 소포자 배 발생 효율을 확인한 결과, 3종에서는 32°C에서 2일간 고온처리 할 경우 배 발생률이 가장 높았고 summer oil형 IT218043에서는 3일간 처리할 경우 가장 높은 배 발생률이 관찰되었다. 또한 소포자 배의 식물체 재분화에 영향을 미치는 식물 성장조절제의 농도를 조사한 결과, 결구배추형인 IT199710에서는 NAA 0.5mg·L⁻¹과 BAP 1mg·L⁻¹를 첨가한 처리구에서 가장 높은 재분화율이 관찰되었으나 순무형인 IT135449와 청경채형 IT212886에서는 성장조절제 무처리구에서 가장 높은 재분화율이 관찰되었다. 소포자 배 유래 재분화 식물체들을 대상으로 배수성 검증을 실시한 결과 종자를 형성한 모든 식물이 자연배가를 통한 이배체 식물임이 확인

M.-S. Seo · S.-H. Sohn · B.-S. Park · M.A. Jin (✉)
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부
(Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-707, Korea)
e-mail: genemina@korea.kr

H.-C. Ko
농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터
(National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-707, Korea)

되었다. 본 실험의 결과는 다양한 배추 유전자원의 소포자 배양효율 증진을 위해 이용될 수 있을 뿐 아니라 획득한 고정 계통은 이후 배추의 육종 및 유전자 기능 연구의 소재로 활용될 수 있을 것이다.

서론

배추(*Brassica rapa*) 유전체의 완전 해독과(Wang et al. 2011) 더불어 차세대 염기서열 분석(NGS) 기술이 발달하면서 표준 유전체 정보를 바탕으로 우수 계통에 대한 유전체 비교 분석 및 이를 통한 특정 형질 관련 유전자의 탐색 및 분자 표지 개발 연구가 활발하게 진행 중에 있다(Blanca et al. 2012; Zou et al. 2013). 자가불화합성이 강한 배추과 작물의 비교 유전체 및 유전자 기능 연구를 위해서 형질이 고정된 유전자원(Diversity Fixed Foundation Set, DFFS) 확보가 선행되어야 하며 세계적으로 이를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Pink et al. 2008; Zhao et al. 2010).

타식성 작물인 배추는 주로 교배육종을 통하여 품종이 육성되기 때문에 형질이 고정된 계통을 육성하는데 많은 시간과 노력이 소요된다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 배추에서는 반수체를 이용하여 고정된 식물체를 대량으로 유기하려는 연구가 지속적으로 이루어져 왔다(Cao et al. 1994; Jo et al. 2012). 십자화과 식물들의 소포자 배양은 유채(*Brassica napus*)에서 처음으로 성공한 이후에 배추 및 브로콜리를 포함한 다양한 식물들에서 반수체 유도의 성공이 보고되고 있다(Lichter R 1982; Ferrie et al. 1995; Na et al. 2011). 최근에는 배추와 무의 속간 교잡종인 배무채라는 새로운 종의 개발에도 소포자 배양이 이용된 것으로 보고된 바 있다(Lee et al. 2011).

소포자 배양을 통한 배 발생에는 모식물의 유전자형이나 생육조건 혹은 배양 배지의 조성이나 배양 환경 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Takahata et al. 1991; Lee et al. 2000; Dias JCD 2001; Gu et al. 2004). 특히 모식물의 유전자형은 소포자를 통한 반수체 배 발생 효율에 크게 영향을 미치는 인자로 보고되고 있다(Ferrie et al. 1995; Kim et al. 1997). 배추의 경우, 품종에 따라 소포자 배양을 통한 반수체배의 유도율이 매우 낮은 경우도 있기 때문에 소포자 배양을 이용하여 다양한 형질을 가진 유전자원의 고정계통을 육성하는데 어려움이 따른다. 농촌진흥청 국립농업유전자원센터에서 보유하고 있는 배추 유전자원은 형태적 특징에 따라 결구 배추형(chinese cabbage), 순무형(turnip), 청경채형(pak choi), 유지작물형(oil) 등으로 구분되어 농업적으로 유용한 형질을 가진 다양한 유전자원이 포함되어 있기 때문에 이들 유전자원의 소포자 배양을 통한 고정 계통의 육성이 이루어져야 할 것이다. 현재까지 배추 소포자 배양법에

대한 연구는 순무형 및 청경채형등의 일부 계통에서 제한적으로 이루어지고 있으며, 소포자 배 발생의 효율도 품종에 따라 매우 낮기 때문에 다양한 계통에 알맞은 배양법의 개선이 절실히 요구되고 있는 실정이다(Baillie et al. 1992; Cao et al. 1994).

본 연구에서는, 국내 배추 유전자원 50종을 대상으로 소포자 배양효율을 비교하고 아종별로 적합한 배양조건을 검토하여 이후 다양한 배추 유전자원의 소포자 배양을 통한 고정계통 육성에 활용하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험을 위한 식물 재료는 농촌진흥청 유전자원센터에서 보유한 배추 유전자원 중 형태적 특성이 다른 유전자원 50종(Table 1)을 분양 받아 사용하였다. 종자는 파종하여 온실에서 약 6주 정도 키운 뒤 4°C에서 24시간 광조건으로 45일간 저온처리를 하고 화분에 정식하였다. 정상적인 생육 과정을 거쳐 개화가 시작된 식물체의 꽃봉오리 중에서 수술의 길이가 주두의 길이보다 짧거나 같은 화뢰의 크기를 계통별로 확인한 후 그 길이와 비슷한 화뢰를 선발하여 소포자 배양에 사용하였다(Fig. 3A).

소포자 분리 및 배양

소포자 배양에 이용된 방법은 십자화과에서 높은 소포자 배양 효율을 보이는 브로콜리의 소포자 배양법(Na et al. 2011)을 변형하여 사용하였다.

유전자원에 따른 소포자 배 발생율을 관찰하기 위하여 유전자원 50종의 종자를 1립씩 파종하여 온실에서 생육 후 각 유전자원별로 화뢰를 수집하였다. 수집된 화뢰는 1% Sodium hypochlorite 용액에서 15분간 소독 후 멸균수로 3회 세정하여 물기를 제거한 다음 사용하였다. 소독된 화뢰는 막자사발에 넣고 13% sucrose 가 첨가된 B5 액체 배지(Gamborg et al. 1968)를 화뢰 당 1mL씩 첨가하여 부드럽게 균질화 시킨 후 70 µm 나일론 망에 용액을 여과시켰다. 여과된 용액은 50 mL falcon tube에 넣고 1000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 상등액을 버린 후 동일한 B5 액체 배지를 동량 첨가하여 세정하는 작업을 3회 반복하였다. 세정이 끝난 소포자 용액은 10% sucrose, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 0.25 g·L⁻¹, AgNO₃ 0.1 mg·L⁻¹, NAA (naphthalene acetic acid) 0.5 mg·L⁻¹, BAP (6-Benzylaminopurine) 0.1 mg·L⁻¹가 첨가된 NLN 액체 배지(Lichter 1982)를 화뢰 당 2.5 mL씩 계산하여 첨가한 후 agarose 활성화된 용액을 0.5배 농도로 희석하여 혼합하였다. Agarose 활성화된 용액은 100 mL 증류

Table 1 Embryo yield in microspore culture for subspecies of *Brassica rapa*

Genotype (subspecies)*	Accession number	No. of bud cultured	No. of obtained embryo	No. of embryos per bud
Chinese cabbage (<i>ssp. pekinensis</i>)	IT32744	50	26	0.520
	IT100349	120	0	0.000
	IT100434	60	22	0.367
	IT120026	110	1	0.009
	IT120059	85	0	0.000
	IT120061	60	25	0.417
	IT135442	50	0	0.000
	IT187883	110	0	0.000
	IT189952	25	1	0.040
	IT199710	20	16	0.800
	IT203422	50	0	0.000
	IT212923	50	1	0.020
	IT212924	215	141	0.656
	IT212946	110	14	0.127
	IT213907	30	3	0.100
	IT214688	160	0	0.000
	IT214691	175	0	0.000
	IT215006	210	0	0.000
	IT221701	315	0	0.000
	IT221740	20	9	0.450
	IT221751	80	6	0.075
	IT221753	50	15	0.300
IT221766	25	1	0.040	
IT221783	30	2	0.067	
pak choi (<i>ssp. chinensis</i>)	IT100403	30	2	0.067
	IT102910	60	4	0.067
	IT102920	170	3	0.018
	IT160325	50	1	0.020
	IT185731	80	0	0.000
	IT187919	135	1	0.007
	IT212886	55	47	0.855
	IT223319	240	1	0.004
caixin (<i>ssp. parachinensis</i>)	IT164994	10	1	0.100
	IT218041	50	0	0.000
	IT218042	40	2	0.050
mizuna (<i>ssp. nipposinica</i>)	IT100406	10	0	0.000
	IT120086	281	42	0.149
neep greens (<i>ssp. perviridis</i>)	IT135410	155	5	0.032
turnip (<i>ssp. rapa</i>)	IT100415	85	2	0.024
	IT102907	60	0	0.000
	IT135430	50	23	0.460
	IT135449	155	185	1.194
	IT136543	55	0	0.000
	IT206702	125	0	0.000
	IT215419	60	0	0.000
summer oil (<i>ssp. dichotoma</i>)	IT204092	150	0	0.000
	IT218043	30	1	0.033
winter oil (<i>ssp. trilocularis</i>)	IT119424	140	0	0.000
	IT135315	40	0	0.000
	IT135321	25	0	0.000

*Subspecies of each accession was extracted from the passport data of RDA Genebank and the genotypes for subspecies follow the nomenclature by Zhao et al. (2005). Genotypes for subspecies were confirmed in field test, 2011.

수에 agarose 0.5 g과 활성탄 2.0 g을 넣고 혼합하여 고압 멸균한 뒤 교반하여 사용하였다. 활성탄이 첨가된 NLN 액체 배지는 일회용 배양접시(60x15 mm)에 2.5 mL씩 분주하였다. 소포자는 배양 초기 온도를 32°C로 설정하여 24시간 동안 암 배양 한 후 25°C 배양실에서 15일간 암 배양하여 소포자 배 발생을 유도하였다.

배양 초기의 고온 처리 기간에 따른 소포자 배 발생률을 조사하기 위하여 아종별로 높은 소포자 배 발생률을 나타내는 유전자원 4종(IT135449, IT199710, IT212886, IT218043)을 선발하여 각 3립의 종자를 추가로 파종하였다(Table 1). 정상적인 생육 과정을 거쳐 개화한 각 식물체들로부터 소포자를 채취한 후 위와 동일한 조건으로 NLN 배지에 분주한 후 32°C에서 1, 2, 3일간 각각 암 배양 한 후 25°C 배양실에서 15일간 배양하여 소포자 배 발생 효율을 조사하였다.

식물체 재분화 및 순화

소포자에서 유도된 배는 25°C shaker에서 30 rpm으로 24시간 동안 명 조건에서 현탁 배양하였다. 성숙한 소포자 배는 식물체 재 분화를 위하여 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본 배지에 각각 치상하여 25°C에서 16시간/일 광주기로 4주간 배양하였다.

2일간의 고온처리에서 가장 높은 배 발생율을 나타낸 유전자원 3종(IT135449, IT199710, IT212886)의 소포자배를 이용하여 식물생장조절제 농도에 따른 재분화 효율을 조사하였다. 유도된 소포자배는 NAA 0.5, 1 mg·L⁻¹와 BAP 1, 2, 3 mg·L⁻¹의 6개 조합이 첨가된 MS 기본 배지에 치상하여 배양 4주 후에 shoot 재분화 효율을 조사하였다. 재분화된 식물체는 MS 기본 배지로 옮겨 뿌리가 유도된 완전한 식물체를 인공상토에서 순화 시켰다.

소포자 배 유래 식물체의 종자 증식 및 배수성 검증

순화된 식물체를 온실에서 약 6주간 재배한 뒤 4°C에서 35일간 저온 처리한 후 화분으로 정식하였고 개화한 식물체를 뇌수분을 이용한 자가수분을 통하여 종자를 획득하였다. 자가수분을 통하여 획득된 종자는 배수성 검증을 위하여 파종 하였고 약 3주정도 재배 한 뒤 어린잎을 채취하였다. 어린잎은 약 0.5×0.5 cm의 크기로 자른 후 일회용 배양접시에서 0.5 mL nuclei extraction buffer를 첨가하고 해부용 면도칼로 30회 정도 잘게 잘랐다. 시료는 필터로 거른 후 2 mL DAPI staining buffer로 염색한 후 Flow cytometry (CyFlow Ploidy Analyzer, Partec, Germany)를 이용하여 배수성 검증을 실시하였다. 배수성 판별을 위하여 Flow cytometry에서 GAIN값을 493으로 고정시킨 후 G1 phase의 DNA 함량 peak가 40~60에 가까우면 2배체, 80~100에 가까우면 4배체로 구분하였다.

결과 및 고찰

배추 유전자원의 소포자 배 발생

다양한 형태적 특징을 가진 배추 유전자원 50종을 대상으로 소포자 배양을 실시한 결과, 30종의 유전자원에서 소포자 배의 유도가 관찰되었고 배 발생률은 유전자원별로 큰 차이를 보였다(Table 1). 결구배추형의 IT212924과 순무형 IT135449에서 화퇴 당 평균 1.264개와 1.194개로 가장 높은 소포자 배 발생률을 보였으나, 그 외의 모든 유전자원에서는 화퇴 당 1개 이하의 낮은 배 발생율이 관찰되었으며 유지작물형 winter oil에서는 배 발생이 관찰되지 않았다.

식물에서 소포자 배 발생율은 모식물의 품종에 따라 크게 달라지며, 다양한 십자화과 식물들에서 품종에 따른 소포자 배 발생율의 차이가 보고된 바 있다(Takahata et al. 1991; Wei et al. 2008; Dubas et al. 2013). 배추의 경우 결구배추형(Baillie et al. 1992; Ferrie et al. 1995)과 유지형(Ferrie et al. 1995) 및 청경채형(Cao et al. 1994) 등에서 소포자 배 발생에 관하여 보고된 바 있다. 그러나 구체적으로 어떠한 유전적 요인이 식물의 유전자형에 따른 소포자 배 발생 효율에 관여하는지에 대해서는 아직까지 밝혀지지 않고 있다.

고온 처리 기간에 따른 소포자 배 발생 효율

십자화과 식물에서 배양 초기의 고온처리는 소포자 배 발생을 촉진하는데 효과적인 것으로 알려져 있다(Na et al. 2011). 본 연구에서는 배추의 유전형에 따른 고온처리 기간의 효과를 검증하기 위하여 순무형(IT135449), 결구배추형(IT199710), 청경채형(IT212886) 그리고 유지작물형(IT218043)에서 고온처리 기간에 따른 소포자 배 발생율을 조사하였다(Fig. 1). 실험 결과, 순무형(IT135449), 결구배추형(IT199710) 그리고 청경채형(IT212886)의 경우는 2일간의 고온처리 구에서 1일 처리구와 비교하여 순무형과 청경채형은 약 30배, 결구배추형은 약 3배로 현저하게 증가된 배 발생율이 관찰되었다. 유지작물형의 경우 1일과 2일 동안의 고온처리구에서는 0.221과 0.2의 매우 낮은 배 발생율이 관찰되었으나 3일 처리구에서는 15.533으로 현저하게 증가한 배 발생 효율이 관찰되었다. 따라서 배추의 소포자 배양에서 고온처리 기간은 배 발생에 매우 큰 영향을 미치고, 고온처리 기간은 아종에 따라 차이가 있음이 확인되었다.

고온처리 기간에 따른 소포자 배 발생율의 증가는 여러 십자화과 식물에서 보고된 바 있다. Ferrie et al.(1995)은 배추 Parkland 품종에 있어서 32°C로 2일간 배양할 경우 가장 높은 배 발생율을 관찰할 수 있었다. 반면에 브로콜리에서는 32.5°C에서 1일간의 고온처리에서 높은 배

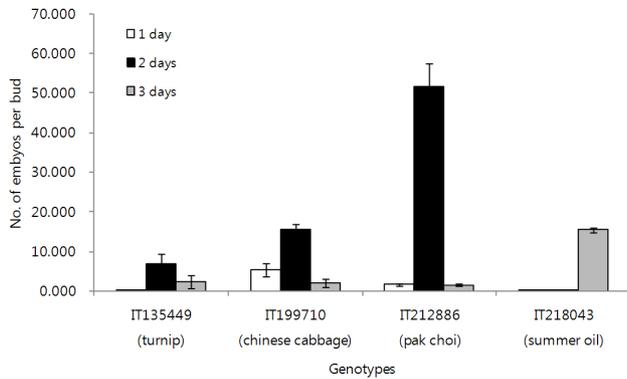


Fig. 1 Effect of heat shock periods on microspore embryogenesis for four accessions of *B. rapa*. Embryos were counted at 15 days after culture. Bars represent the mean with standard deviation for three independent experiments

발생율이 관찰되었다(Na et al. 2011). 식물의 소포자 배양에 있어서 고온처리는 배 발생에 효과적인 것으로 알려져 있으나 고온처리가 소포자의 분화 및 발달과정에 영향을 미치는 기구에 관하여 명확하게 밝힌 연구는 많지 않다. 브로콜리의 소포자 배양에 관한 연구에서는 소포자 배 발생 과정에서 heat shock protein (HSP)의 형성이 관찰되었으며 정상적인 housekeeping 단백질의 생성이 억제되는 것이 관찰되었다(Fabijanski et al. 1991). 이들 결과를 통하여 고온처리에 의한 HSPs가 소포자에 의한 배 발생 유도 매커니즘에 관여하고 있을 것으로 추정되었다. 반면에 고온처리는 세포막의 기능적 특징들에 영향을 주는 생체세포들에서 세포막을 둘러싼 단백질들의 활성에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Joosen et al. 2007). 유체의 소포자 배양에서는 고온처리가 ABA농도의 증가를 일으켜 소포자 배 발생 효율을 증가시킨다고 보고하였다(Dubas et al. 2013). 그러나 아직까지 ABA농도와 소포자 배 발생의 직접적인 상관관계는 밝혀진 바 없다. 따라서 식물의 소포자 배양에 영향을 미치는 고온처리 효과에 관한 기구를 규명하기 위한 보다 많은 분자 생물학적 연구들이 이루어져야 할 것이다.

본 실험의 결과 배추 유전자원의 소포자 배양을 통한 배 발생 효율을 조사한 결과 배 발생 효율이 낮은 식물일 지라도 고온 처리 기간을 조절함으로써 배 발생 효율을 높일 수 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 배추의 소포자 배양은 유전적 요인과 함께 배양조건 등의 외부적 요인의 상호작용에 의하여 이루어지는 것으로 사료된다.

식물체 재분화 및 배수성 검증

소포자 배로부터 식물체의 재분화 효율에 영향을 미치는 식물 성장조절제의 농도를 조사한 결과 성장조절제의 농도에 따른 재분화율이 계통에 따라 차이가 있음이 관찰

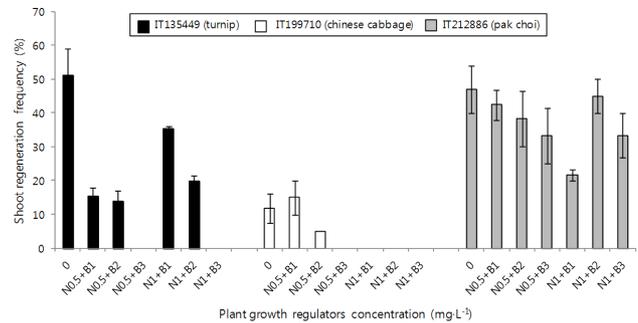


Fig. 2 Effects of plant growth regulators on shoot regeneration frequency from microspore-derived embryos of *B. rapa*. Bars represent the mean with standard deviation for two independent experiments. N: NAA, B: BAP

되었다(Fig. 2). 결구배추형인 IT199710은 NAA $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 과 BAP $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 를 첨가하였을 때 가장 높은 재분화 효율이 관찰되었다. 청경채형(IT212886)의 경우, NAA $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 과 BAP $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 조합에서 높은 재분화율이 관찰되었다. 반면에 순무형(IT135449)의 경우 성장조절제의 첨가가 오히려 소포자배의 재분화율에 부정적인 효과를 나타내었다. 결구배추형(IT199710)의 경우 소포자로부터 배 발생율은 순무형(IT135449) 보다 높은 반면 소포자 배로부터 재분화는 순무형(IT135449), 청경채형(IT212886)과 비교하여 낮은 재분화율을 나타내었다. 식물에 따라서는 성장조절제의 첨가가 소포자배의 식물체 재분화 효율의 증가에 영향을 미친다고 보고된 바 있으나(Kim et al. 2012), 본 실험의 결과 식물 성장조절제는 유전자형에 따라 재분화율의 향상에 영향을 미칠 수 있으나 성장조절제의 첨가가 소포자 배의 재분화에 필수적인 요인으로 작용하지는 않는 것으로 조사되었다.

소포자 배발생(Fig. 3B) 및 재분화 과정(Fig. 3C)을 거쳐 온실에서 자란 식물체들(Fig. 3D)은 자가수분을 통해 종자를 증식하였고 종자 증식에 성공한 6계통, 16 식물체에서 배수성 판별을 실시한 결과, 모든 식물체에서 G1 phase의 DNA 함량 peak가 40~60 사이에 위치한 이배체로 확인되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 본 실험을 통해 유기된 반수체 배가 배양과정을 거치면서 자연배가가 일어나기 때문에 임성을 회복한 것으로 보이며 자연배가가 되지 못한 반수체 식물체이거나 3배체, 5배체 등의 식물체인 경우는 화분을 형성하지 못하는 등의 이유로 임성을 회복하지 못한 것으로 생각된다. 또한 소포자 배양을 통해 생산되는 4배체의 경우 임성을 회복하는 경우가 있으나 본 실험의 결과, 모든 식물체는 이배체로 배가되었음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 소포자 배양 과정에서 일어나는 염색체의 자연배가에 대해서는 밀을 포함한 여러 식물체에서도 이미 보고된 바 있다(Cistué et al. 2006; Pathirana et al. 2011).

본 실험의 결과를 통하여 소포자 배양 효율이 낮은 배

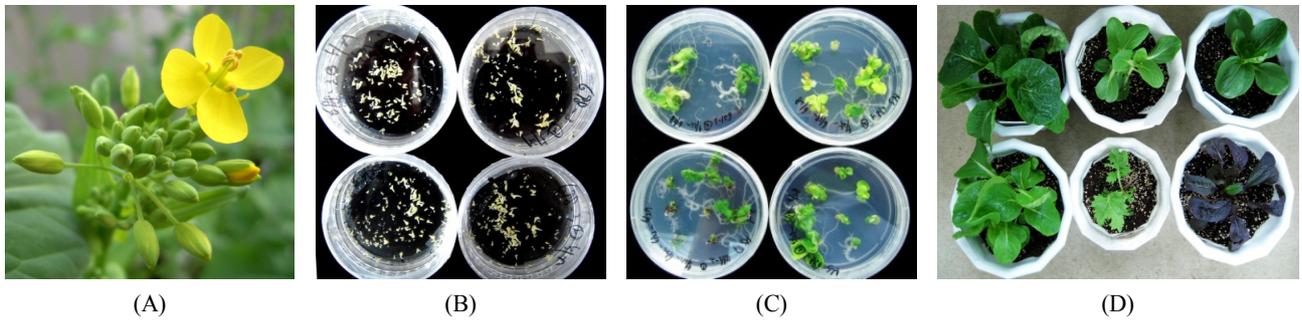


Fig. 3 The process of embryogenesis and plant regeneration derived from microspore. (A) Sampling time for flower buds of *B. rapa* subsp. *pekinensis*, (B) Embryogenesis derived from microspore after 15 days of culture, (C) Regenerated shoots from microspore-derived embryos after 4 weeks of culture on MS medium, (D) Acclimatized plantlets in greenhouse

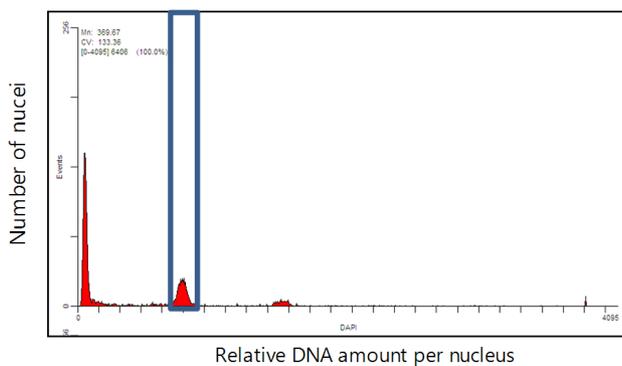


Fig. 4 Flow cytometric histogram of IT135449 showing diploid in DNA content

추 유전자원의 효율적인 소포자 배양 체계가 확립되었고 이러한 배양 조건을 활용하여 다양한 배추 유전자원의 소포자 배양을 통한 계통육성에 활용할 예정이다. 또한 소포자 배양을 통해 고정된 배가반수체 계통은 배추과 작물의 유전체 연구 및 특정 형질 관련 분자 육종 연구의 소재로써 사용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 어젠다 사업(과제 번호: PJ008673)의 지원에 의하여 수행되었습니다. 본 연구 수행에 있어서 연구적 조언과 정보를 제공해 주신 국립원예특작과학원 박수형 박사님과 실험에 참여해 주신 국립농업과학원 백분자·장창덕 연구원님께 감사드립니다.

References

Baillie AMR, Epp DJ, Hutcheson D, Keller WA (1992) In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. Plant Cell Rep 11:234-237

Blanca J, Esteras C, Ziarsolo P, Pérez D, Fernã Ndez-Pedrosa V, Collado C, Rodrã Guez de Pablos R, Ballester A, Roig C, Cañazares J, Picó B (2012) Transcriptome sequencing for SNP discovery across Cucumis melo. BMC Genomics 13:280

Cao MQ, Li Y, Liu F, Dore C (1994) Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) via in vitro isolated microspore culture. Plant Cell Rep 13: 447-450

Cistué L, Soriano M, Castillo AM, Vallés MP, Sanz JM, Echávarri B (2006) Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Rep 25:257-264

Dias JCD (2001) Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Euphytica 119:389-394

Dubas E, Janowiak F, Krzewska M, Hura T, Żur I (2013) Endogenous ABA concentration and cytoplasmic membrane fluidity in microspores of oilseed rape (*Brassica napus* L.) genotypes differing in responsiveness to androgenesis induction. Plant Cell Rep DOI 10.1007/s00299-013-1458-6

Fabijanski SF, Altosaar I, Arnison G (1991) Heat shock response during anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Plant Cell Tissue Org Cult 26:203-212

Ferrie AMR, Epp DJ, Keller WA (1995) Evaluation of *Brassica rapa* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. Plant Cell Rep 14:580-584

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Ept. Cell Res 50: 151-158

Gu HH, Hagberg P, Zhou WJ (2004) Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Growth Regulation 42:137-143

Jo MH, Ham IK, Park MY, Kim TI, Lim YP, Lee EM (2012) Seed production ability of doubled haploid plants through microspore culture in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30(5):573-578

Joosen R, Cordewener J, Supena EDJ, Vorst O, Lammers M, Maliepaard CH, Zeilmaker T, Miki B, America T, Custers J, Boutillier K (2007) Combined transcriptome and proteome

- analysis identifies pathways and robust markers associated with the establishment of *Brassica napus* microspore-derived embryo development. *Plant Physiol* 144:155-172
- Kim YH, Lee SS (1997) Microspore culture of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) and Korean turnip (*B. campestris* ssp. *rapa*). *J Kor Soc Hort Sci* 38:368-371
- Kim KS, Lee YH, Cho HJ, Jang YS, Park KG (2012) Effects of culture condition on embryogenesis in microspore culture of *Brassica napus* L. domestic cultivar ‘Tammiyuchae’. *Korean J Crop Sci* 57:317-323
- Lee SS and Kim AJ (2000) Effects of cultural vessel, plant growth regulator, illuminating and shaking on embryo induction and growth in microspore culture of heading chinese cabbage. *J Kor Soc Hort Sci* 41:16-20
- Lee SS, Lee SA, Yang JM, Kim JK (2011) Developing stable progenies of *xBrassicoraphanus*, an intergeneric allopolyploid between *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*, through induced mutation using microspore culture. *Theor Appl Genet* 122: 885-891
- Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* Z. *Pflanzenphysiol* 105:427-434
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Na HY, Kwak JH, Chun CH (2011) The effects of plant growth regulators, activated charcoal, and AgNO₃ on microspore derived embryo formation in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Hort Environ Biotechnol* 52:524-529
- Pathirana R, Frew T, Hedderly D, Timmerman-Vaughan G, Morgan E (2011) Haploid and doubled haploid plants from developing male and female gametes of *Gentiana triflora*. *Plant Cell Rep* 30:1055-1065
- Pink D, Bailey L, McClement S, Hand P, Mathas E, Buchanan-Wollaston V et al. (2008) Double haploids, markers and QTL analysis in vegetable Brassicas. *Euphytica*, 164(2):509-514
- Takahata Y, Keller WA (1991) High frequency embryo-genesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci* 74:235-242
- Wang XW, Wang HZ, Wang J, Sun RF, Wu J, Liu SY, Bai YQ, Mun JH, Bancroft I, Cheng F, Huang SW, Li XX, Hua W, Wang JY, Wang XY et al. (2011) The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat Genet* 43: 1035-U1157
- Wei Z, Qiang F, Xigang D, Manzhu B (2008) The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Scientia Horticult* 117:69-72
- Zhao J, Artemyeva A, Pino Del Carpio D, Basnet RK, Zhang N, Gao J, Li F, Bucher J, Wang X, Visser RGF, Bonnema G (2010) Design of a *Brassica rapa* core collection for association mapping studies. *Genome* 53:884-898
- Zhao J, Wang X, Deng B, Lou P, Wu J, Sun R, Xu Z, Vromans J, Koornneef M, Bonnema G (2005) Genetic relationships within *Brassica rapa* as inferred from AFLP fingerprints. *Theor Appl Genet* 110:1301-13041
- Zou Z, Ishida M, Li F, Kakizaki T, Suzuki S, Kitashiba H, Nishio T (2013) QTL analysis using SNP markers developed by next-generation sequencing for identification of candidate genes controlling 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate contents in roots of radish, *Raphanus sativus* L. *PLOS* 8:e53541