

소포자 배양의 시기와 조건이 양배추의 배발생에 미치는 효과

박민영 · 장하영 · 임용표 · 이정수 · 박수형

Influence of culture duration and conditions on embryogenesis of isolated microspore culture in cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata*)

Min Young Park · Ha-Young Jang · Yong Pyo Lim · Jung-Soo Lee · Suhyoung Park

Received: 6 September 2016 / Revised: 7 November 2016 / Accepted: 15 November 2016
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Our aim was to find the effective duration and culture conditions for microspore culture in a genetically variant cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata*). We discovered that the ‘2×NLN medium containing AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 13%’ was most efficient in producing the cabbage embryos. The number of induced embryos was higher in F₂ or F₃ progeny generation than the F₁ hybrid cultivar used as plant materials. Thus, we recommend microspore culturing using progeny plants of failed F₁ cultivar. The acquisition ratio of embryos and plants derived from microspore was higher in the early flowering period as compared to the late flowering period. When transplanted in the soil, 71.2% plants developed from the early flowering period, compared to 27.0% from the middle period and 1.8% plants from the late period. Thus, we recommend microspore culture using buds collected during the early flowering period.

Keywords *Brassica*, Microspore cultivation, Doubled-haploid, Embryogenesis, Inbred lines

서 언

배추과 채소에는 무, 배추, 양배추, 브로콜리 등 다양한 국내

의 주요 채소가 포함된다. 특히 배추의 소포자 배양 기술은 국립원예특작과학원에서 오래 전부터 배추과 채소의 품종 개발에 활용해온 방법으로 소포자 배양 유래 식물체의 종자를 증식하여 다양한 계통을 육성하게 되었다. 최근에는 무, 양배추, 브로콜리 등 다양한 채소에 적용하고자 배양 조건을 구명하는 연구를 수행하고 있다.

배추과 채소는 소포자 배양이 용이하여 최초로 유채에서 성공한 후(Lichter 1982) 약배양보다 배양 노력이 적게 필요한 장점으로 인하여 다양한 배추과 채소에서 배양이 시도되었다. 에디오피아겨자(*Brassica carinata* BRAUN) (Chuong and Beversdorf 1985), 양배추(*Brassica oleracea* L.) (Takahata and Keller 1991), 결구배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) (Sato et al. 1989), 팍초이(*Brassica rapa* ssp. *Chinensis*) (Cao et al. 1994), 그리고 무(*Raphanus sativus* L.) (Takahata et al. 1996)에서 소포자 배양에 성공하였다. 국내에서도 배추와 무의 속간교잡종인 배추무(*×Brassicoraphanus*)의 소포자 배양을 시작(Hong and Lee 1995)하여 식물체 유도에 성공하였으며, 배추 무름병 저항성 순계 육성(Lee et al. 2001)을 위한 소포자 배양과 Hong et al. (2005)에 의해 배추의 계통을 육성하였다는 보고가 있다.

배추과 채소의 소포자 배양은 배양하는 식물체의 품종, 배양조건(배지종류, 배양온도, 고온처리 조건, 배양용기 등)과 화뢰의 크기 등 배양하는 식물체의 상태도 배양 결과에 영향을 끼치는 것으로 보고되었다(Chuong and Beversdorf 1985; Sato et al. 1989; Takahata and Keller 1991; Cao et al. 1994; Takahata et al. 1996).

양배추의 소포자 배양은 Cao et al. (1990)이 처음 시도한 바가 있으며, Takahata와 Keller (1991)에 의해 양배추 소포자 유래 식물체 유도에 성공한 후, 다양한 조건의 양배추 소포자 배양을 통해 DH식물을 생산하려는 연구가 계속되어지고 있다(Hansen 2000; Shugui et al. 2006).

M. Y. Park · H.-Y. Jang · J.-S. Lee · S. Park (✉)
농촌진흥청 국립원예특작과학원
(National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural
Development Administration, Wanju 55365, Korea)
e-mail: psh@korea.kr

M. Y. Park · Y. P. Lim
충남대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Chungnam National University,
Daejeon 34134, Korea)

국내에서도 녹색꽃양배추의 소포자배양(Lee and Nam 1995)을 시작으로, 최근 양배추의 뿌리혹병 저항성 양배추 계통 육성(Kwak et al. 2013) 및 배양 조건에 따른 소포자 배양 효율에 관한 연구(Park et al. 2014) 등 양채류 및 양배추 소포자 배양에 관한 연구가 수행되어 오고 있다.

국립원예특작과학원 채소과에서는 유전적으로 서로 다른 다양한 종류의 양배추를 이용하여 sucrose, NLN(Nitsch and Nitsch 1967; Lichter 1982)배지의 농도, 성장조절제 등의 첨가유무를 달리한 4개 조성과, 다양한 고온처리조건의 소포자 배양을 실시하여 효과적인 조건을 찾고, 배양효율을 높이는 방안을 모색하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료

국내외의 도입 양배추(*Brassica oleracea* L.) 시판 품종 및 자가수정 후대 종자를 소포자 배양에 활용하였다. 중국 품종 유래 유전자원 9점, 일본 및 한국 품종 유래 유전자원 5점을 소

포자 배양의 재료로 이용하였다. 14점 중 9점은 중국 주요 품종인 ‘극조감람’ 품종을 자가수정하여 육성된 ‘11-FS25’, ‘11-FS26’, ‘11-FS58’과, 또 다른 중국 주요 품종인 ‘경풍 1호(11-FS60)’, 그의 자가수정으로 육성된 ‘11-FS33’, ‘11-FS34’, ‘11-FS35’, ‘11-FS54’, ‘11-FS55’이며 모두 녹색 양배추 품종 유래 유전자원이다. 나머지 5점은 한국에서 판매되고 있는 일본 품종인 ‘중생루비아(11-FS59)’와 그 후대인 ‘11-FS28’과 ‘11-FS47’, 그리고 ‘루비아’ 품종에서 유래된 ‘11-F29’와 ‘11-FS30’이며 적색 양배추 품종에서 유래된 유전자원이다 (Table 1). 각 유전자원은 2011년 가을 노지 포장에서 재배한 후 생육조사를 위해 지상부는 수확하고, 지하부를 가운이 되는 비닐하우스로 옮겨 심은 후 이듬해 2012년 봄부터 추대를 유도하여 개화를 유도하면서 배양하였다. 전체 개화는 4월초부터 7월초까지 유전자원에 따라 서로 달랐으며, 유전자원 당 3-4개 식물체의 꽃봉오리를 채취하여, 개화 초기부터 말기까지 순차적으로 배양을 진행하였다(Fig. 1).

소포자의 분리 및 배 발생 유도

소포자의 분리를 위하여 전체 중 1~2개 개화한 꽃봉오리에

Table 1 Information of plant materials used for the microspore culture of cabbage (*B. oleraceae* L. var. *capitata*) in this study

Material	Generation ^a	Variety name(Original)	Company	Introduced country	Outer leaf color	Growing period
11-FS25	F ₂	Geuk-jo-gam-nam(極早甘藍)	Quality Seed	China	Green	Early
11-FS26	F ₂	Geuk-jo-gam-nam(極早甘藍)	Quality Seed	China	Green	Early
11-FS28	F ₂	Jung-saeng Rubiya	Takii Korea	Korea	Red	Medium
11-FS29	F ₂	Rubia	Takii Korea	Korea	Red	Medium Late
11-FS30	F ₂	Rubia	Takii Korea	Korea	Red	Medium Late
11-FS33	F ₃	Gyeong-pung 1ho(京豊1號)	XingShen	China	Green	Late
11-FS34	F ₃	Gyeong-pung 1ho(京豊1號)	XingShen	China	Green	Late
11-FS35	F ₃	Gyeong-pung 1ho(京豊1號)	XingShen	China	Green	Late
11-FS47	F ₃	Jung-saeng Rubiya	Takii Korea	Korea	Red	Medium
11-FS54	F ₃	Gyeong-pung 1ho(京豊1號)	XingShen	China	Green	Late
11-FS55	F ₃	Gyeong-pung 1ho(京豊1號)	XingShen	China	Green	Late
11-FS58	F ₃	Geuk-jo-gam-nam(極早甘藍)	Quality Seed	China	Green	Early
11-FS59	F ₁	Jung-saeng Rubiya	Takii Korea	Korea	Red	Medium
11-FS60	F ₁	Gyeong-pung 1ho(京豊1號)	XingShen	China	Green	Late

^aMaterials of F₂ and F₃ were advanced generation from F₁ varieties by seed harvest.

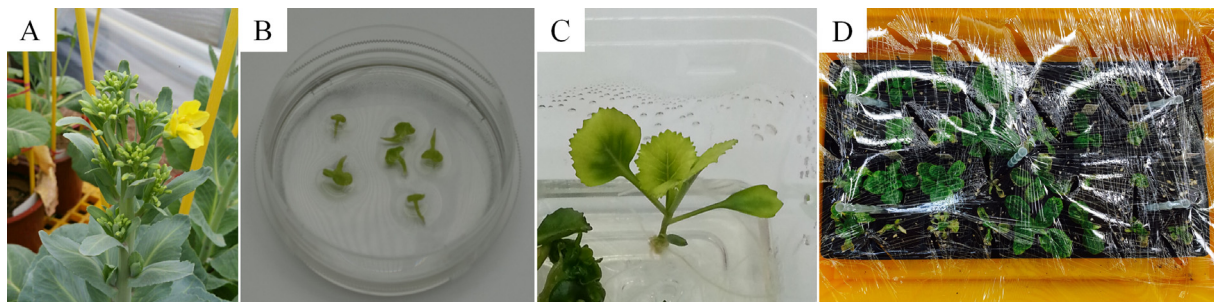


Fig. 1 Results of microspore cultivation in cabbage (*B. oleraceae* L. var. *capitata*). (A) Flower buds, (B) Induced embryos, (C) Regenerated normal roots and leaves for transplanting on MS medium, (D) Trans planting to the soil

Table 2 Medium and chemical components of microspore culture media

Number	Medium and components
10	2xNLN, AgNO ₃ 1 mg/l, sucrose 13%
11	2xNLN, AgNO ₃ 1 mg/l, sucrose 13%, NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l
12	2xNLN, AgNO ₃ 1 mg/l, sucrose 15%
13	2xNLN, AgNO ₃ 1 mg/l, sucrose 15%, NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l

Table 3 Number of regenerated embryo, transferred onto solid MS media, transplanted into the soil derived from microspore of cabbage (*B. oleraceae* L. var. *capitata*)

Material	Total buds (No.)	Embryo induced buds (No.)	Regenerated embryos (No.) ^a	Transferred embryos (No.) ^b	Transplanted plantlets (No.)
11-FS 25	230	190	3532	856	86
11-FS 26	180	180	3650	1273	79
11-FS 28	60	50	193	192	4
11-FS 29	110	100	36	29	7
11-FS 30	20	0	0	0	0
11-FS 33	60	10	1	1	0
11-FS 34	40	0	0	0	0
11-FS 35	170	115	63	60	22
11-FS 47	70	70	240	228	23
11-FS 54	70	0	0	0	0
11-FS 55	70	0	0	0	0
11-FS 58	180	160	1669	867	46
11-FS 59	230	155	126	94	3
11-FS 60	230	110	39	34	6
Total	1720	1140	9549	3634	276

^aRegenerated embryos were counted after about 18 days from microspore isolation.

^bMore than 7 mm size and normal shaped embryos were transferred onto solid MS media.

서 크기 2-3 mm 정도의 화뢰를 30개 선별하여 거즈로 포장한 후, 차아염소산나트륨(2%)에 15분 표면살균 후 멸균수로 3분간 3회이상 세척하였다. 이후 표면살균 된 화뢰를 2-3 ml의 NLN(Nitsch and Nitsch 1967; Lichter 1982) 배지에서 막자사발로 갈아 45 µm체로 거른 후 원심분리를 위해 30 ml의 NLN배지에 현탁하였다. 원심분리는 1,000 rpm에서, 3분간 실시하였으며, 1회 원심분리가 끝나면 윗부분의 맑은 상정액을 클린벤치에서 버리고 다시 새로운 NLN배지를 첨가하는 방식으로 3회 반복 실시하였다. 이후 분리된 소포자는 성장조절제(NAA, BAP), 활성탄 등이 첨가된(Table 2) 75 ml의 NLN배지에(농도 2x) 현탁한 후 배양을 위해 지름 6 cm petridish에 2.5 ml씩 분주하여 parafilm과 랩으로 밀봉하였다. 평균적으로 1개의 화뢰를 1개의 petridish에 분주하도록 농도와 부피를 맞추었다(Lee and Nam 1995).

소포자의 배 발생 유도를 위하여 30°C의 암상태로 24시간 및 48시간, 또는 72시간 처리한 후 25°C로 약 2주 동안 유지하였으며, 이후 25°C명실로 옮겨 75-80 rpm으로 진탕배양하며 배의 발생을 관찰하였다.

식물체 재분화 및 순화

소포자유래 발생된 배는 진탕배양기에서 약 7 mm이상의

크기가 될 때까지 유지하였으며, 식물체 재분화를 위하여 3% sucrose가 포함된 1/2MS(Murashige and Skoog, 1962)고체 배지로 옮겨주었다. 이후 정상적인 잎과 뿌리를 유도하기 위해 1~2차 계대배양을 수행하였다.

뿌리까지 잘 발달된 소포자 유래 식물체는 토양 순화를 위해 멸균된 바이오 상토가 담긴 32공 육묘용 트레이(Bumnong, Korea)로 옮겨 심었다. 모상은 상대습도 유지를 위해 랩으로 밀봉해 주었으며 잘록병 등을 예방하기 위해 hymexazol 입상수용제 1 mg/l 용액을 수시로 관주 하였다. 이후 식물체의 상태를 관찰하며, 밀봉된 랩을 순차적으로 벗겨주는 방식으로 순화 하였으며, 약 2~3주 적응한 식물체들은 5°C 생육상으로 옮겨, 채종을 위해 4~5개월 동안 춘화처리 하였다.

결과 및 고찰

품종 별 배 및 정상 식물체 발생 효과

다양한 품종의 양배추 14개 유전자원의 소포자 배양 결과, 10개의 유전자원에서 배의 발생을 유도 할 수 있었다(Table 3). 14개 유전자원 전체 1,720개의 화뢰를 소포자 배양에 이용하여 10개 유전자원의 1,140개의 화뢰에서 배의 발생이 관

Table 4 Results of embryo yield per bud of each experimental material of cabbage (*B. oleraceae* L. var. *capitata*), using different media

Variety	Material	Generation	Regenerated embryos per bud (No.) ^a	Transferred embryos per bud (No.) ^b	Regenerated Media (No.) ^c
Geuk-jo-gam-nam	11-FS 25	F ₂	15.4±4.76	3.7±1.30	10, 12
	11-FS 26	F ₂	20.3±4.12	7.1±1.29	10, 12
	11-FS 58	F ₃	9.3±1.79	4.8±1.17	12, 10
Jung-saeng Rubiya	11-FS 59	F ₁	0.6±0.16	0.4±0.13	10, 12
	11-FS 28	F ₂	3.2±1.17	3.2±1.16	10, 12
	11-FS 47	F ₃	3.4±2.98	3.3±2.85	10, 11
Gyeong-pung Iho	11-FS 60	F ₁	0.2±0.07	0.2±0.07	13, 10
	11-FS 35	F ₃	0.4±0.14	0.4±0.16	11, 13
Rubia	11-FS 29	F ₂	0.3±0.12	0.3±0.11	10, 11

^aEach values represents the mean ±SE (n=more 5) of each material.

^bMore than 7mm size and normal shaped embryos were transferred onto solid MS media.

^cThe regenerated embryo number was high in first media, followed by second media. The media components are as follows: No. 10 (2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 13%), No. 11 (2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 13%, NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l), No. 12 (2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 15%), No.13 (2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 15%, NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l)

찰되었다. 소포자 배양에 사용된 화뢰 모두에서 배의 발생이 관찰된 유전자원도 있었으며('11-FS26', '11-FS47') 배의 발생량 또한 각 유전자원 별로 다양 하였다(Table 3). 전체 9,549개의 배가 발생이 되었으며, 이들 중 육안으로 보았을 때 활력이 우수한 3,634개의 배를 선별하여 MS고체배지로 치상하였다. 치상 후 재분화가 지속 된, 9개 유전자원에서 뿌리와 잎을 형성한 276개의 식물개체가 유도되어 토양에 순화하였다(Table 3). 녹색 양배추인 '극조감람', 품종에서 유래된 '11-FS25', '11-FS26', '11-FS58'의 화뢰 당 평균 배 발생 개수 (Mean no. of embryos per bud)가 각각 15.4, 20.3 및 9.3 개로 다른 품종 유래 유전자원보다 가장 높았다(Table 4). '극조감람 > 중생루비야 > 경풍 1호 > 루비야' 순으로 평균 배 발생량이 높았으며, 배 발생개수가 다른 품종에 비해 높은 2품종의 경우, 후대 유전자원 모두에서 배 발생이 되었다. 배 발생개수가 가장 낮았던 '경풍 1호'의 경우 6개(일대잡종 1개, 후대 5개) 중 2개(일대잡종 1개, 후대 1개) 유전자원에서만 배가 발생되었고 4개 유전자원에서는 전혀 배가 발생되지 않았다. 또한 '루비야' 품종의 경우 후대 2개중 1개 유전자원에서만 배가 발생되었다(Table 3, 4). 본 연구 결과 양배추의 각 유전자원 별로의 소포자유래 배의 발생량은 다양하며, 차이가 크게 보였으나, 품종 별로 소포자유래 배가 잘 발생하는 품종과 그렇지 못한 품종의 분류가 가능하였다. 이와 같이 소포자 배 발생 효율이 품종 별로 상이한 결과는 과거 팍초이의 소포자 배양 시 배 발생 결과가 유전적 배경에 따라 서로 다르다는 보고(Zhang et al. 2012)와 유사하였으며, 그 외에도 소포자배양 결과가 모식물의 품종에 따라 큰 차이를 보인 결과는 과거 무(Takahata et al. 1996), 케일(Wei et al. 2008) 등 십자화과 및 다양한 식물에서 보고된 바 있다. 그러나 소포자 배양의 결과를 좌우하는 모식물의 유

전자형의 어떠한 특정 요인이 관여하는지는 아직까지 밝혀진 바가 없으며, 유전적인 요인을 찾기 위한 연구를 위해서는 소포자유래 배 발생을 위한 더욱 확립 된 배양조건에 관한 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

소포자 배 발생에 미치는 세대의 영향

화뢰 1개 당 소포자 유래 배의 발생개수를 기준으로 하였을 때, 소포자 배양 결과가 가장 우수했던 '극조감람' 품종의 경우, 자가수정을 1회(F₂)와 2회(F₃) 실시한 결과에서 세대와 관계없이 화뢰 당 평균 배 발생량이 높았다(Table 4). 반면에 배양 효율이 낮은 품종의 경우에는 일대잡종세대(F₁)보다는 자가수정 한 후대유전자원(F₂, F₃)의 배 발생 효율이 높았다(Table 4). '중생루비야' 품종의 경우, 수집품종인 '11-FS59 (F₁)'와 그 후대인 '11-FS28 (F₂)', '11-FS47 (F₃)'의 화뢰 당 평균 배 발생 개수는 각각 0.6, 3.2, 3.4로 다음세대로 진전될수록 평균 배 발생 개수가 높아지는 결과를 확인하였다(Table 4). '경풍1호'의 경우도 '11-FS60 (F₁)'과 '11-FS35 (F₃)'의 봉오리당 평균 배 발생 개수가 각각 0.2 그리고 0.4로 일대잡종세대보다 그 후대의 유전자원에서 결과가 더 높은 것을 확인하였다(Table 4). 본 연구 결과 배양 효율이 높은 품종의 경우에는 세대별 소포자 배양 결과의 차이가 거의 없으며 유전자원 별 소포자유래 배 발생 개수가 세대에 관계없이 모두 높은 것을 확인하였다. 반면에 배양 효율이 낮은 품종의 경우에는 자가수정 되어 세대가 진전된 후대로 갈수록 소포자 유래 배 발생 개수가 증가하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과에 의하여 양배추의 소포자 배양 시 배양에 사용된 유전자원의 소포자 배양 효율이 낮아 발생된 배가 거의 없거나 부족한 경우, 자가수정 한 후대 개체를 배양하면 목

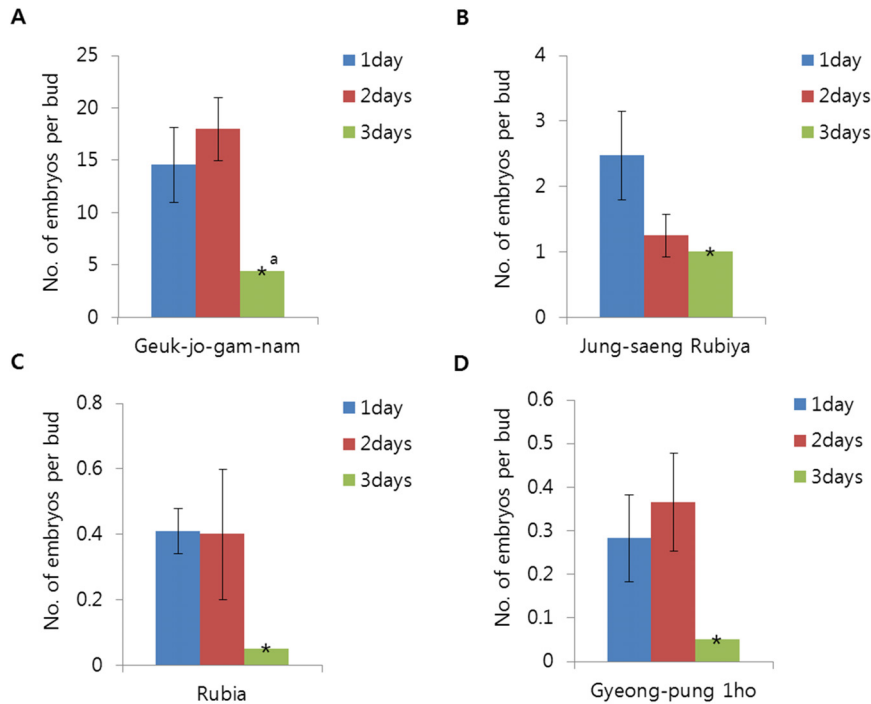


Fig. 2 Effect of high temperature periods on microspore embryogenesis for four varieties of cabbage (*B. oleraceae* L. var. *capitata*). Vertical bars show standard errors (n=A; 17, B; 10, C; 3, D; 11)

^aThe 3 days treatment was performed just once, since the number of embryo was low after microspore cultivation

적하는 배의 개수를 획득할 수 있을 것으로 판단되었다.

고온처리 일수의 효과

양배추의 배 발생 유도를 위한 효과적인 고온처리 일수는 품종 별로 다양하게 나타났다(Fig. 2). 전체적으로는 1일 처리한 것보다 2일 처리에서 배의 발생량이 높았으며, 3일 처리는 현저히 낮은 결과를 보였다(Fig 2). 품종 별로는 녹색 양배추 유전자원(‘극조감람’, ‘경풍 1호’)의 경우 1일 보다는 2일 고온처리가, 자색 양배추 유전자원의 경우(‘중생루비야’, ‘루비야’)는 2일 처리보다 1일 고온처리가 배양 효과가 더 높게 나타났다(Fig. 2). 십자화과 식물의 소포자 배양에 있어 화뢰로부터 소포자를 분리 한 직후의 고온처리는 배 발생에 중요한 요소로 작용되며, 처리 온도와 기간에 따라 소포자유래 배의 발생 효율에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Ferrie et al. 1995; Na et al. 2009). 최근 국내에서도 배추의 소포자 배양에서 배추의 유전형 별로 고온처리 기간에 따라 배 발생 효율이 달라진다는 보고가 있었으며(Seo et al. 2014), 본 연구에서는 양배추의 소포자 배양을 통해 고온처리 기간이 유전자원 별 배 발생 효율에 미치는 영향을 조사한 결과, 걸잎 색이 녹색인 품종은 2일, 자색인 품종은 1일 고온처리가 배의 발생 개수가 가장 높은 것을 확인하였다. 양배추 소포자 배양에 있어 걸잎 색 과 고온처리일수와의 관계가 있는지의 여부는 추가적인 실험이 필요한 것으로

판단되었다. 그리고 고온 처리 기간에 의한 소포자 배양 효율은 유전자원 별로 서로 다를 수 있으므로, 1일 또는 2일간의 처리를 모두 실시 한 후 세부 조건을 결정하는 것을 추천한다.

배지조성의 효과

다양한 양배추 품종 별 소포자 배양에 효과적인 배지 조성을 찾기 위하여 유전자원 별로 배의 발생량이 가장 높은 2개 조성을 조사 하였다(Table 4). 배의 발생 개수가 높고, 다양한 유전자원에서 배가 유도 되었던 조성은 10번 배지(2×NLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 13%)였고 각 유전자원 별 차이는 있으나 4개 품종 모두에서 다른 배지에 비하여 배 발생량이 가장 높게 확인되었다(Table 4). 그리고 유전자원 별로 배의 발생개수가 가장 높은 배지는 다양하였다(Table 4). 화뢰 1 개 당 배의 발생량이 가장 높았던 품종인 ‘극조감람’에서는 sucrose 15%의 농도에서 배 발생량이 가장 높게 확인되었고, 이를 제외한 3개 품종에서 sucrose 15% 농도 보다는 13%의 농도가 더 배의 발생에 효과적이었다. 다른 품종에 비해 소포자 유래 배 발생 개수가 높았던 2개 품종인 ‘극조감람’과 ‘중생루비야’의 경우 성장조절제(NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l)가 첨가되지 않은 10번(2×NLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 13%), 12번(2×NLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 15%) 배지에서 화뢰 당 배 발생 개수, 정상적으로 재분화 되어 토양에 순화된

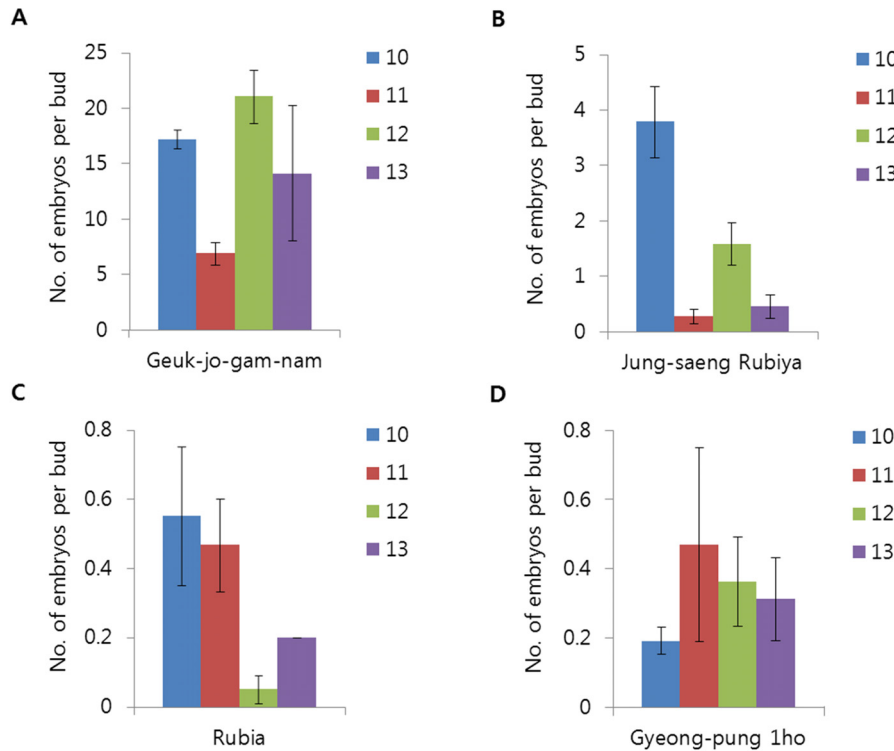


Fig. 3 Effect of medium components on microspore embryogenesis for four varieties of cabbage (*B. oleraceae* L. var. *capitata*). Vertical bars show standard errors (n=A; 5, B; 4, C; 2, D; 5). The different media components were: No. 10 (2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 13%), No. 11 (2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 13%, NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l), No. 12 (2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 15%), No.13 (2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 15%, NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l)

개수가 많았다 (Table 4, Fig. 3). 화퇴 당 배 발생 개수가 적었던 ‘경풍 1호’, ‘루비아’ 품종의 경우는 성장조절제(NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l)가 포함된 11번(2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 13%, NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l) 과 13번(2xNLN, AgNO₃ 1 mg/l, sucrose 15%, NAA 0.05 mg/l, BAP 0.05 mg/l)배지에서 많은 수의 배가 발생되었다(Table 4). 이러한 결과를 통하여 sucrose 농도와 성장조절제의 유무가 양배추의 소포자 유래 배 발생에 영향을 주는 것을 확인하였다. 배의 발생량이 많은 품종의 경우 sucrose의 농도가 높을수록 효과가 높으며, 성장조절제는 배의 발생에 있어 부정적인 영향을 주는 것으로 판단되었다. 반면에 배의 발생량이 적은 품종의 경우, 높은 농도의 sucrose 함량은 오히려 배 발생에 있어 부정적인 효과를 보이며, 배의 발생량이 극히 적은 품종에 있어서는 성장조절제가 배 발생에 도움을 주는 것으로 판단되었다. 과거 특정 농도의 성장조절제가 브로콜리(Na et al. 2011)의 소포자 배양에서 배 발생량에도 영향을 주는 것으로 보고된 바 있으며, 배추(Na et al. 2009), 유채(Kim et al. 2012)의 소포자 배양에서는 성장조절제가 발생된 배의 식물체 재분화 및 생육향상에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서는 일부 배 발생량이 낮은 양배추 유전자원의 소포자 배양에서 성장조절제가 소포자로부터 배로 재분화 되는 과정 중 배 발생에 영향을 주는 것을 확인

하였다(Table 4, Fig. 3). 본 실험 결과를 통하여 양배추의 소포자 배양 시 유전자원 별로 소포자가 배로 잘 발달되는 배지의 조성이 서로 다르며, 성장조절제의 효과도 상이한 것이 확인되었다. 따라서 처음 배양하는 유전자원의 경우 최소 4 종류(성장조절제 유무)의 배지로 시험 배양을 하는 것이 효과적일 것으로 판단되었다.

개화시기와 배 발생 및 식물체 재생

배 발생이 되지 않거나, 생육이 왕성한 배가 발생되지 않은 하위 5개 유전자원을 제외한 9개 유전자원을 이용하여 소포자 배양 시기별 결과를 조사하였다. 배양시기는 개화기간과 사용 꽃봉오리 개수를 고려하여 초기, 중기, 말기로 나누어 분석하였다. 9개 유전자원의 배양시기는 처음 꽃봉오리 개화에서 마지막 배양까지 길게는 76일, 짧게는 29일이며, 평균 54일 이었다(결과 미제시). 처음 개화 후 2주에서 3주 사이 유전자원 별 꽃봉오리 발생량이 가장 많았으며 배양에 사용될 수 있는 화퇴의 생육상태도 우수하였다. 소포자 배양 시기별 배 발생 개수, MS고체배지로 옮겨진 개체 수, 토양으로 순화된 식물 개체 수를 비교하였다. 9개 유전자원 전체의 소포자 배양 시기별 결과에 의하면, 배의 발생 개수는 소포자 배양 초기, 중기, 말기 각각 전체 배 발생수의 43.8, 35.8 및

Table 5 Effects of microspore culture duration on embryo induction and plant regeneration in cabbage (*B. oleraceae* L. var. *capitata*)

Material	Regenerated embryos			Transferred embryos			Transplanted plantlets		
	Early ^a	Middle ^b	Late ^c	Early	Middle	Late	Early	Middle	Late
	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)
11-FS25	441(12.5)	2402(68.0)	689(19.5)	284(33.2)	423(49.4)	149(17.4)	74(86.0)	9(10.5)	3(3.5)
11-FS26	1510(41.4)	950(26.0)	1190(32.6)	465(36.5)	301(23.6)	507(39.8)	55(69.6)	19(24.1)	5(6.3)
11-FS28	93(48.2)	5(2.6)	95(49.2)	92(47.9)	5(2.6)	95(49.5)	4(100)	0(0.0)	0(0.0)
11-FS29	21(58.3)	10(27.8)	5(13.9)	20(69.0)	4(13.8)	5(17.2)	7(100)	0(0.0)	0(0.0)
11-FS35	20(31.7)	40(63.5)	3(4.8)	28(46.7)	29(48.3)	3(5.0)	17(77.3)	5(22.7)	0(0.0)
11-FS47	210(87.5)	19(7.9)	11(4.6)	198(86.8)	19(8.3)	11(4.8)	9(39.1)	14(60.9)	0(0.0)
11-FS58	560(33.6)	669(40.1)	440(26.4)	418(48.2)	383(44.2)	66(7.6)	24(52.2)	19(41.3)	3(6.5)
11-FS59	24(19.0)	64(50.8)	38(30.2)	18(19.1)	64(68.1)	12(12.8)	1(33.3)	2(66.7)	0(0.0)
11-FS60	24(61.5)	14(35.9)	1(2.6)	21(61.8)	12(35.3)	1(2.9)	5(83.3)	1(16.7)	0(0.0)
Total (%)	43.8	35.8	20.4	49.9	32.6	17.5	71.2	27.0	1.8

Duration of microspore culture (Early, Middle, Late) were based on mean of cultivated flower bud number and days after the first flowering.

^aAfter first flowering to 14 days (cultivated 56.1 flower bud) ^bAfter early period to 34 days (cultivated 53.9 flower bud)
^cAfter middle period to 55 days (cultivated 55.6 flower bud)

20.4% 로 배양 초기가 높았으며, MS 고체 배지로 옮겨지는 개수도 49.9, 32.6 및 17.5%로 배양 초기가 생육이 왕성한 배의 개수가 많았다. 정상적인 뿌리와 잎을 형성하여 토양순화 된 개체수의 비율은 초기, 중기, 말기 각각 71.2, 27.0 및 1.8%로, 배양초기의 배에서 유래 된 개체들의 비율이 월등히 높았다(Table 5). 배의 발생의 경우 ‘11-FS25’, ‘11-FS35’, ‘11-FS58’, ‘11-FS59’ 4개 유전자원을 제외한 5개 유전자원에서, MS고체배지에 치상 된 개수의 경우, ‘11-FS25’, ‘11-FS35’, ‘11-FS59’ 3개 유전자원 제외한 6개 유전자원에서, 토양순화의 경우, ‘11-FS47’, ‘11-FS59’을 제외한 7개 유전자원에서 배양 결과가 초기 > 중기 > 말기 순으로 높았다(Table 5). 주목할만한 점은 ‘11-FS25’, ‘11-FS35’의 경우 배양중기가 배양 초기보다 배 발생, 치상 개체수의 결과가 높았음에도 불구하고, 토양순화 된 정상 식물개체수의 비율은 ‘11-FS25’, ‘11-FS35’ 각각 배양초기 중기 말기 기준 86.0, 10.5, 3.5%와 77.3, 22.7, 0.0%로 배양초기로부터 유래된 개체들의 비율이 월등히 높았다(Table 5). 이러한 결과들에 의하면 양배추의 소포자 배양 시, 유전자원 별로 차이는 있으나, 대부분의 유전자원에서 전체 개화 기간 중 개화 초기 > 중기 > 말기 순으로 배 발생, MS고체배지로 치상, 토양순화 개수의 결과가 높은 것을 확인하였다. 이는 개화 초기에 수집된 화퇴일수록 활력이 우수하고 소포자 활력에도 연관이 있으며, 배 발생 뿐 아니라 배의 생육, 뿌리와 잎을 형성하는 식물체 재분화에도 영향을 주는 것을 확인하였다. 이에 따라 초기 소포자의 활력이 소포자로부터 유래되어 배와 식물체로 발달되는 전체 시기에 영향을 주는 것으로 판단되었다. 그리고, 양배추를 이용하여 소포자배양을 하고자 할 때, 저온처리 후 꽃봉오리가 발생하는 전체 기간 동안 배양을 진행하는

것보다, 짧게는 개화 초기(첫 개화 후 14일 까지)에만, 늦어도 개화 중기의 초기까지 배양을 진행하는 것이 배양 성공 및 노동력 절감 차원에서 더 효율적이라고 판단되었다.

적 요

유전적으로 다양한 양배추 유전자원들의 소포자 배양을 통하여 배양에 효과적인 시기와 배양 조건을 구명하기 위해 본 연구를 실시하였다. 그 결과, ‘2×NLN, AgNO₃ 1 mg/l, 13%의 sucrose’로 조성 된 배지 조건에서 배 생산에 효과적임을 확인할 수 있었다. 배양 재료로 사용된 유전자원 중 소포자로부터 유도된 배 발생 개수는 일대잡종 세대 보다 자가 수정 후대인 F₂ 또는 F₃ 세대에서 높았다. 이러한 결과를 통하여 양배추의 일대잡종 품종에서 소포자 배양 시 배의 획득에 실패한 경우, 그의 자손 세대를 사용하여 소포자 배양을 지속하는 것을 추천한다. 그리고 소포자로부터 유도된 배와 식물개체 수는 개화 초기의 결과가 중기 및 말기 보다 높았다. 토양순화 된 식물체의 경우는 중기와 말기의 각각 27.0 % 및 1.8 %인 것에 비하여 개화 초기에 유도된 비율이 71.2 %였다. 따라서 소포자 배양에 활용할 꽃봉오리는 개화 초기에 채취하여 사용할 것을 권장한다.

사 사

본 연구는 농림수산식품부 GSP 채소종자사업단의 연구과제(213002-04-4-SBI20)와 농촌진흥청 연구사업(PJ0102752016)에 의해 수행되었다.

References

- Cao MQ, Li Y, Liu F, Doré 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
- Cao MQ, Charlot F, Doré C (1990) Embryogenesis and plant regeneration in sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L. subsp. *capitata*) by *in vitro* culture of isolated microspores. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Series 3, Sciences de la Vie* 310:203–209
- Chuong PV, Beversdorf WD (1985) High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *Brassica Carinata braun* L. *Plant Sci* 39:219–226
- Hansen M (2000) ABA treatment and desiccation of microspore-derived embryos of cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata* L.) improves plant development. *J Plant Physiol* 156:164–167
- Hong SY, Lee SS (1995) Microspore culture of \times *Brassicoraphanus*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci* 36:453–459
- Hong SY, Cho KS, Moon JY, Ryu SY, Lee HC, Yoon HK (2005) Microspore culture and its progeny test for resistant line to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in chinese cabbage. *Kor. J. Hort. Sci. Technol* 23:45
- 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
- Kwak JH, Park MY, Chae WB, Kim DY, Park SH, Cheong SR, Yoon MY (2013) Development of clubroot resistant cabbage lines by microspore cultivation. *J. Kor. Soc. Hort. Sci* 31:101
- Lee SS, Nam SC (1995) Microspore culture of broccoli. *J. Kor. Soc. Hort. Sci* 36:635–640
- Lee SS, Kim JK, Jun W, Choi WJ (2001) Development of dihaploid lines resistant to *Erwinia carotovora* in chinese cabbage. *J. Kor. Soc. Hort. Sci* 42:682–684
- Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzen physiologie* 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, Park SH, Hwang GY, Yoon MK, Chun CH (2009) Medium, AgNO₃, activated charcoal and NAA effects on microspore culture in *Brassica rapa*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol* 27:657–661
- 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
- Nitsch C, Nitsch JP (1967) The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. *Planta* 72:355–370
- Park MY, Kwak JH, Yang EY, Lee WM, Chae SY, Yoon MK, Choi KJ (2014) The effect of various pH on medium, plant growth regulators, and heat shock on the production of embryos in microspore culture of cabbage. *J. Kor. Soc. Hort. Sci* 32:111
- Sato T, Nishio T, Hirai M (1989) Plant regeneration from isolated microspore cultures of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep* 8:486–488
- Seo MS, Sohn SH, Park BS, Ko HC, Jin MN (2014) Efficiency of microspore embryogenesis in *Brassica rapa* using different genotypes and culture conditions. *J Plant Biotechnol* 41:116–122
- Shugui F, Wenhui C, Xiaoling Z, Chaohui Z, Xiaozhen L, Xueli Z (2006) Isolated-microspore culture and plantlet regeneration in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.). *Acta Horticulturae Sinica* 33:158
- Takahata Y, Keller WA (1991) High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci* 74:235–242
- Takahata Y, Komatsu H, Kaizuma N (1996) Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.): influence of genotype and culture conditions on embryogenesis. *Plant Cell Rep* 16:163–166
- 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
- Zhang Y, Wang A, Liu Y, Wang Y, Feng H (2012) Improved production of doubled haploids in *Brassica rapa* through microspore culture. *Plant Breeding* 131:164–169