

발간등록번호

11-1543000-000434-01

비대칭 원형질체 융합을 통한 응성불임 육종 자원 개발

(Development of CMS introduced breeding line by asymmetric
protoplast fusion)

동부팜한농(주)

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “비대칭 원형질체 융합을 통한 응성불임 육종 자원 개발” 과제(제 1세부과제 “분자마커를 이용한 응성불임 자원 분류 시스템 구축” 및 제 1협동과제 “비대칭원형질체 융합 기술을 이용한 응성불임 자원 생산”)의 보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 동부팜한농(주)

주관연구책임자 : 성 순 기

세부연구책임자 : 성 순 기

연 구 원 : 이 영 표

연 구 원 : 최 연 옥

연 구 원 : 정 주 연

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 유 장 렬

연 구 원 : 김 석 원

연 구 원 : 지 은 이

연 구 원 : 장 혜 립

2 0 1 4 년

요 약 문

I. 제 목

비대칭 원형질체 융합을 통한 옹성불임 육종 자원 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

무, 배추, 양배추, 브로콜리, 유채 등이 속해있는 십자화과 작물은 우리나라는 물론 세계적으로 경제성이 매우 큰 작목이다. 현재 대부분의 십자화과 작물의 F₁ 종자는 자가불화합(自家不和合, self incompatibility)과 옹성불임성(雄性不稔, male sterility)을 이용하여 종자를 생산(채종)하고 있다. 따라서 옹성불임 기반 육종기술 보유 여부에 의해 채소 종자 시장의 경쟁력이 결정될 수 있다. 현재 상업적으로 이용되고 있는 대부분의 십자화과 옹성불임 자원은 1968년 무에서 개발된 Ogura 옹성불임자원을 다른 십자화과 작물(양배추, 브로콜리, 청경채, 배추, 유채 등)에 도입한 자원이다. 십자화과 채소 작물 중에서 자가불화합과 옹성불임성을 이용한 F₁ 종자 육종기술은 국내 종자회사가 세계적인 수준이다. 그러나 Ogura 옹성불임을 도입한 옹성불임 십자화과 자원을 상업 육종에 이용하기 위해서는 복잡한 특허문제와 높은 로얄티 지불 문제가 걸림돌이 되고 있다. 이러한 문제로 인해 일부 글로벌 종묘회사 이외에는 Ogura 옹성불임자원을 상업 육종에 사용을 못하고 있는 실정이다. 한편 중국, 인도 등 아시아권 국가들의 F₁ 종자 시장이 급속하게 성장하고 있는 추세이고, 다국적 종묘회사가 경쟁적으로 시장진출을 모색하고 있기 때문에 국내에서도 상업적으로 활용 가능한 신규 옹성불임 자원 개발에 대한 적극적인 노력이 시급한 실정이다.

2007년 동부팜한농(주)에서는 Ogura 옹성불임 자원과는 다른 신규 무 옹성불임 자원(Dongbu Cytoplasmic-Genic Male Sterility; DCGMS) 개발하고, 이들의 임성 회복에는 단일유전자가 관여한다는 것을 밝혔다(특허출원번호: 10-2008-0031591 논문: *Theor. Appl. Genet.* (2008) 117: 905-913). 신규 개발된 무 옹성불임자원(DCGMS)을 원형질체 융합 기술을 통해 다른 십자화과(양배추, 유채, 배추, 브로콜리등)에 도입하면 기존 특허를 회피한 십자화과 옹성불임 육종 재료를 확보할 수 있다. 아울러 DCGMS 자원과 원형질체 융합 기술을 이용해 우수한 육종 소재를 많이 만들 수 있다면 세계적 수준인 국내 종묘회사의 채소육종 기술과 더불어 고품질/고순도 신품종 육성이 가능할 뿐 만 아니라 신품종 육성 기간을 획기적으로 단축시킬 수 있다. 본 과제를 통해 개발된 신규 옹성불임 중간 모본을 활용하여 십자화과 품종을 개발한다면 채소 종자 시장의 국제적 경쟁력 확보뿐 아니라 유채와 같은 산업용 작물에도 적용 가능

하여 바이오 디젤을 비롯한 에너지 산업에도 활용 가능한 원천 기술 확보가 가능할 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에서는 원형질체 융합 callus를 조기에 판별할 수 있는 시스템 개발과 무 옹성불임라 인(DCGMS) 및 십자화과 (양배추, 유채, 브로콜리, 및 배추) 작물의 원형질체 분리 및 원형질체로부터 식물체 재생 체계를 확립하고자 하였다. 또한 옹성불임 무와 각 십자화과 작물별 핵 및 세포질 불활성화 체계를 확립한 다음 이들의 비대칭원형질체 융합 및 배양을 통하여 옹성불임 cybrid 식물체 개발 체계를 확립하고자 하였다. 더 나아가 DCGMS 옹성불임 후보 유전자 탐색 및 cybrid 식물체 생산 효율을 증대함으로써 개발된 옹성불임 cybrid 식물체 라인들이 십자화과 채소의 중간모본으로서 활용될 수 있는 체계를 확립하고자 하였다. 본 과제의 최종 목표는 원예적 검증을 통해 상업 육종에 활용할 수 있는 신규 옹성불임 자원을 개발하는데 있다.

IV. 연구개발결과

1. 원형질체 융합 callus 조기 판별 분자마커 시스템 개발

본 연구에서는 기존에 통상적으로 해오던 원형질체 융합 기술을 벗어나 분자마커의 접목으로 보다 효율적인 연구를 진행하고자 하였다. 즉 원형질체 융합 callus 단계에서 분자마커를 이용하여 조기에 원형질체 융합 여부를 판단해 원형질체 융합이 되지 못한 callus는 도태시키고, 원형질체 융합이 된 callus에서도 DCGMS의 미토콘드리아만 전이되고 엽록체는 recipient의 엽록체를 가진 callus를 선발하여 식물체를 얻고자 하였다. 이를 위해 무(DCGMS)와 십자화과 작물(양배추, 브로콜리, 유채, 배추)의 미토콘드리아 및 엽록체 DNA 다형성 분석을 실시하였다. 다형성 분석은 미토콘드리아/엽록체 유전자 coding region에서 프라이머를 제작하여 intergenic region의 다형성을 탐색하였다. 결과적으로 총 5개의 DCGMS 미토콘드리아를 식별할 수 있는 분자마커 및 엽록체 식별 분자마커를 개발하는데 성공하였고 원형질체 융합 callus의 조기 판별에 활용 하였다.

2. 양배추/유채/브로콜리/배추 자원 확보 및 원형질체 분리체계 확립

원형질체 융합 식물재료로 사용될 무 옹성불임 라인과 양배추, 브로콜리, 유채, 배추 등 십자화과 작물의 라인을 확보하고 기내 배양 체계를 확립해서 식물체를 대량 증식 시킨 후 각각의

작물별로 최적의 원형질체 분리조건을 확립하였다.

가. 무용성불임(DCGMS) 라인 확보 및 원형질체 분리체계 확립

본 연구에 사용된 무 용성불임(DCGMS) 라인은 제 1세부 연구팀에서 제공된 종자를 사용하였다. 약 1주일 무균 발아된 유식물체의 자엽 및 배축 약 1 g을 수거하여 세포벽분해효소용액(VCP: Viscozyme, celluclast 및 pectinEX (Novozyme) 혼합 용액으로 처리하여 최종 회수된 원형질체는 약 5×10^5 정도 이었다.

나. 유채/배추/브로콜리/양배추의 기내배양 및 원형질체 분리 및 배양체계 확립

무균발아된 유채의 소식물체의 자엽으로부터 CPW 13M용액 (CPW salts +13% mannitol) 전처리 시간 및 효소 용액 배양시간이 원형질체 분리 효율에 미치는 영향을 조사한 결과 세포벽분해효소 처리시간이 4시간에서 16시간으로 증가할수록 원형질체 yields는 약 2-6배 정도 증가함을 알 수 있었다. 유채, 배추, 브로콜리, 및 양배추 자엽유래 원형질체 배양에 미치는 생장 조절제의 영향을 조사하기 위하여 2,4-D와 BA를 여러 농도로 혼용 처리하여 원형질체의 세포분열 효율을 조사한 결과 2,4-D는 1-3 mg/L 범위 그리고 BA는 0.3-0.5 mg/L 범위내의 혼용 처리가 세포분열 효율이 좋음을 알 수 있었다. 또한 원형질체 배양에 미치는 osmoticum 및 원형질체 배양밀도가 유채의 원형질체 배양에 미치는 영향을 조사한 결과 배양밀도가 1×10^4 개에서는 9% mannitol 과 6% myo-inositol 모두 세포분열이 이루어지지 않았으며 배양밀도가 5×10^4 개에서는 9% mannitol 과 6%myo-inositol 처리구에서 약 15% 분열 효율을 보였다. 아울러 1×10^5 및 2×10^5 처리구에서는 분열 효율이 20-25% 정도로 mannitol 및 myo-inositol 처리구에서 모두 높은 효율의 세포분열을 관찰 할 수 있었다. 아울러 원형질체 배양에 미치는 탄소원으로 sucrose 및 glucose가 유채의 원형질체 배양에 미치는 영향을 조사한 결과 배양밀도가 1×10^5 개에서는 3% sucrose 및 3% glucose의 세포분열 효율은 각각 18%, 20%이었다. 그러나 배양밀도가 2×10^5 개에서는 세포분열 효율이 각각 30% 및 25%로 증가됨을 알 수 있었다.

상기의 원형질체 분리 및 배양체계를 이용하여 본 연구과제의 각 작물별로 분열 효율을 조사한 결과 배추는 배양밀도가 5×10^4 개에서 분열효율이 30%로 가장 높았고 양배추, 유채 및 브로콜리의 경우 배양밀도가 증가할수록 분열효율이 증가하여 23%, 15% 및 18% 임을 알 수 있었다.

3. 양배추/유채/브로콜리/배추 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립

확립된 십자화과 작물의 원형질체 분리 및 배양 체계를 통해 각 작물별로 고효율 식물체 재생 체계를 확립하였다.

가. 양배추 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립

양배추 자엽 유래 원형질체로부터 얻어진 callus를 BA 2 mg/L와 NAA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨 배양한 결과 약 1달 정도 후에 callus로부터 shoot가 발생함을 관찰하였고 신장이 이루어진 shoot를 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS 배양배지로 옮겨 배양한 결과 뿌리가 발생하는 것을 관찰하였다.

나. 유채 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립

유채 자엽 유래 원형질체로부터 얻어진 callus를 BA 2 mg/L와 NAA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨 shoot를 유도하였으나 자엽 explant의 결과와는 달리 callus 증식만 이루어지면서 shoot 발달을 관찰 할 수 없었다.

다. 브로콜리 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립

브로콜리 원형질체로부터 얻어진 callus를 zeatin 2 mg/L, IAA 0.2 mg/L, GA₃ 0.03 mg/L를 첨가한 MS 배양배지에 옮겨 배양한 결과 약 1달 정도 후에 shoot가 유기 되었고, 신장이 이루어진 shoot를 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS 배지에 옮겨 배양한 결과 뿌리가 발생되었고 뿌리가 신장된 후 토양에 옮겨 순화시켰더니 정상적으로 식물체 발달이 이루어짐을 관찰할 수 있었다.

라. 배추 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립

배추 원형질체로부터 얻어진 callus를 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L를 첨가한 MS agar 배지에 옮겨 신초를 유도했으나 callus만 증식하였고 자엽 explant의 결과와는 달리 신초 발달을 관찰 할 수 없었다.

4. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 세포질 융합체계 확립

Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 융합체계 확립을 위하여 무의 핵 불활성화 및 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추)의 세포질 불활성화 체계를 확립하였으며 전기융합 조건을 규명하여 각 작물별로 효율적인 비대칭원형질체 융합체계를 확립하였다.

가. 무 원형질체의 핵 불활성화 체계 확립

감마선의 세기를 각각 0, 300, 500, 700, 1000, 1500 Gy 로 조정하여 무 식물체에 조사한 다음 원형질체를 분리하여 배양을 통해 최적 세기를 조사한 결과 300 Gy 이상 방사선 조사가 이루어지면 무 식물체의 핵이 불활성화됨을 알 수 있었다. 또한 방사선의 세기가 너무 높을 경우 식물체에 손상을 주어 융합 효율이 떨어질 수 있으므로 융합에 사용되는 무 식물체의 경우 500 Gy 이상을 조사하지 않는 것이 적당할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 융합에 사용되는 적정한 방사선 세기를 300~500 Gy 정도 조정하여 무의 핵 불활성화에 사용하였다.

나. 양배추/유채/브로콜리/배추 원형질체의 세포질 불활성화 체계 확립

양배추의 세포질을 효과적으로 불활성화 시키기 위해서는 3 mM IOA로 처리시간은 5~10분 이내, 유채 원형질체는 5 mM로 처리시간은 10분, 브로콜리 원형질체는 3 mM로 처리시간은 5분, 그리고 배추 원형질체는 5 mM로 처리시간은 5분 정도로 처리하는 것이 세포의 손상을 최소화하고 융합에 적합한 세포질 불활성화 조건임을 알 수 있었다.

다. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 융합체계 확립

무와 십자화과 작물의 전기 융합 과정은 먼저 25~40 V/cm 세기로 20~30초 동안 교류를 통과 시켜 원형질체간의 사슬을 형성시킨 후 1,250~1400 V/cm 세기로 60 usec 동안 직류 전기충격을 주어 원형질체 융합을 실시하였다.

라. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 융합 효율 증대

각 작물별로 원형질체 배양을 통한 세포괴의 형성 효율이 상이하였다. 따라서 무와 양배추를 이용하여 핵 공여자(무)에 조사하는 방사선 세기 조정 및 화학물질 (DMSO 등) 첨가, IOA 처리 시간 변화 등의 시험을 통해 원형질체 융합 효율 증대 방안을 모색하였다. 아울러 각 작물별로 전기적 조건과 융합 버퍼의 조성 및 pH, 원형질체의 밀도 및 혼합 비율 변화 등 제반 요건의 미세한 조건들을 다양하게 변경하면서 융합 세포를 관찰하고 효율이 높고 반복 재현성이 높은 융합 체계를 개발하였다.

5. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 융합 원형질체로부터 cybrid 식물체 재생 기술 개발

상기의 원형질체 융합 조건 규명, 배양체계 및 원형질체 융합체계를 이용하여 각 작물별로 원형질체 융합 cybrid 식물체 재생 체계를 확립하였다. 또한 원형질체 배양후 얻어진 callus 단계에서 분자마커로 핵과 세포질을 도입여부를 분석해서 조기에 cybrid 선발하고자 하였다. 아

울러 식물체 재생 효율을 높일 수 있는 요인들을 추가적으로 규명하고자 하였다.

가. 무와 양배추 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발

무와 양배추가 융합된 세포는 배양 후 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 콜로니 단계까지 분열하였고 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 형성된 callus를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA 2 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS, gelrite 0.4% 배지로 옮겨 배양한 결과 다수의 싹초가 유도되었다. 분자마커를 이용하여 cybrid 여부를 조사한 결과 무 세포질과 양배추 핵을 가진 cybrid callus 라인은 14개이고 그 중 10개는 무(DCGMS) 미토콘드리아만 가지고 있는 cybrid callus로서 옹성불임 식물체로 재생될 경우 상업 육종에 활용이 가능한 자원이 될 것으로 예상하고 있다.

나. 무와 유채 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발

무와 유채의 융합 원형질체 재생 체계를 개발하였다. 무와 유채가 융합된 세포는 배양 후 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 콜로니 단계로 분열하였고 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 3-4 주 정도 후에 micro calli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS, 0.8% agar 배지로 옮겨주어 싹초를 유도하였으나 식물체 재생이 이루어지지 않았다.

다. 무와 브로콜리 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발

무와 브로콜리가 융합된 세포는 배양 후 약 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 2~3주 사이에 콜로니 단계로 분열하였다. 이를 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 2,4-D 0.5 mg/L와 BA 2 mg/L를 첨가한 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 Zeatin 2 mg/L, IAA 0.2 mg/L, GA₃ 0.03 mg/L가 첨가된 MS 0.4% gelrite 배지로 옮겨주었더니 싹초가 유도되었다. 유기된 싹초는 성장조절제를 제외한 1/2 MS 배지에 옮겨 뿌리 형성을 유도하여 무와 브로콜리의 cybrid 식물체를 재생하는데 성공하였다. 현재 무 세포질과 브로콜리 핵을 가진 cybrid callus로 검증되어 유지하고 있는 식물체는 향후 식물체로 순화하여 화기 구조 및 원예적 특성 검정을 진행할 예정이다.

라. 무와 배추 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발

무와 배추가 융합된 세포는 배양 후 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 콜로니 단계로 분열하였고 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 2,4-D 0.5 mg/L와 BA 2 mg/L를 첨가한 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA 5 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS 0.8% agar 배지로 옮겨 약 1달 정도 신초를 유도한 후 Zeatin 0.2 mg/L가 첨가된 MS B5 0.8% agar 배지로 다시 옮겨 2차로 신초를 유도하였다. 2차 이식 후 약 1달 후에 무와 배추 융합 callus에서 유래한 신초가 유도되었다. 유도된 신초를 성장조절제를 제거한 1/2 MS 기본 배지에 옮겨주었더니 뿌리가 형성되었고 IBA 0.3 mg/L가 첨가된 1/2 MS 기본 배지로 옮겨 뿌리 증식을 유도하여 무와 배추의 cybrid 식물체를 재생하는데 성공하였다. 향후 식물체로 순화하여 화기 구조 및 원예적 특성 검정을 진행할 예정이다. 특히 배추의 경우 상업적으로 활용할 수 있는 융성불임 자원이 거의 없는 실정이기 때문에 성공적으로 융성불임 배추가 개발되어 진다면 상업적 가치가 매우 클 것으로 예상되고 있다.

마. Donor(무)와 recipient(양배추/유채) 융합 원형질체로부터 식물체 재생 효율 증대

양배추의 경우 기내에서 배양중인 cybrid plant를 육종의 중간모본으로 직접적으로 활용하기 위해서는 다수의 cybrid plant 확보가 필요하다. 따라서 확립된 안정적인 원형질체 융합 체계를 이용해 목적하는 cybrid plant를 다수 생산하고자 하였다. 따라서 본 연구과제의 대상 작물 중에서 타작물에 비해 융합 및 재분화 효율이 높고 재현성이 좋아 cybrid 확보가 용이한 양배추를 우선으로 대량 생산 체계를 확립하였다.

유채의 경우 연구 개발 초기에 사용된 유채의 식물체 재분화율이 높지 않아 비교적 식물체 재분화율이 높은 것으로 알려진 유채 라인들을 새로이 선발하여 무와 유채의 원형질체 융합 및 cybrid 식물체 재생체계를 새로이 확립하였다. 그 결과 BN 11라인이 가장 적합한 라인으로 선발되었으며 무와 유채의 융합 callus로부터 식물체 재생에 필요한 식물생장조절제의 종류 및 농도를 재차 규명하여 융합 callus를 BA 5 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L가 첨가된 MS 배지에 3% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 고체 배지에서 배양한 결과 무와 유채의 융합 callus로부터 효과적으로 신초가 유도된 것을 관찰하였다. 발달이 이루어진 신초를 성장조절제를 제외한 1/2 MS 기본 배지에 옮겨 약 3주 정도 더 배양 하였더니 뿌리가 발생되면서 정상적인 식물체로 발달되는 것을 관찰할 수 있었다. 향후 식물체로 순화하여 화기 구조 및 원예적 특성 검정을 진행할 예정이다.

6. FT-IR 분광분석을 통한 hybrid, cybrid 식물체 판별 기술 개발

원형질체 융합을 통해 생산되어진 cybrid line 중 상당히 많은 개체들이 실제적으로는 목적

하는 세포질 융합이 되지 않은 경우가 많기 때문에 대량 생산되는 cybrid callus의 원형질체 융합 여부를 조기에 판별해서 선별된 것들을 집중 관리할 수 있는 검증 시스템이 생산 효율을 높이는데 무엇보다 중요하다. 따라서 원형질체 융합을 통해 증식이 이루어진 다수의 융합 callus로부터 cybrid 후보 callus를 조기에 선별하기 위한 시스템을 DNA 분광분석을 통해 확립하였다.

가. Genomic DNA 적외선 분광분석을 통한 비대칭융합 cybrid 식별 체계 확립

무(세포질 DNA 공여체)와 양배추(핵DNA 공여체)의 비대칭 원형질체 융합을 통하여 만들어진 세포질 융합체(cybrid)로부터 추출된 genomic DNAs 시료로부터 적외선분광 스펙트럼 분석을 통한 cybrid 식물체 식별체계를 확립하였다.

나. Genomic DNA 적외선 분광분석을 통한 무와 양배추 hybrid 식별 기술 개발

무와 양배추 genomic DNA의 FT-IR 스펙트럼을 통해 무와 양배추 그리고 이들의 DNA가 혼합된 DNA의 식별이 가능함을 알 수 있었다.

다. Genomic DNA의 FT-IR 분광 분석을 통한 배추, 양배추 그리고 유채의 식별 기술 개발

무와 양배추 그리고 유채와 이들의 혼합 genomic DNA 용액으로부터 얻어진 FT-IR 스펙트럼 데이터를 PCA 분석한 결과 무와 양배추 그리고 유채 genomic DNA의 식별이 가능하였다. 따라서 본 기술은 생물종 genome의 진화적 측면을 연구할 수 있는 새로운 단서를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

7. DCGMS 융성불임 후보 유전자 탐색

무의 신규 융성불임 자원(DCGMS)의 융성불임 유전자는 아직 밝혀진 바가 없고, DCGMS의 융성불임성을 타 십자화과로 성공적인 전이를 위해서는 융성불임 유전자를 확인하는 것이 매우 중요한 연구이다. 본 연구에서는 무의 short repeat sequence들을 확인하고 이를 기반으로 한 DCGMS에서만 존재하는 신규 ORF를 탐색하였다. 결과적으로 총 1,389개의 염기(nucleotide)로 구성되어 있었으며, 단백질은 총 463개의 amino acid로 구성 되어있는 DCGMS 특이적인 신규 ORF 유전자를 확인하였다(*orf 463*이라 명명). 또한 *orf 463* 유전자는 발현이 되는 유전자이며 DCGMS의 융성불임 후보 유전자로 판단되어 미토콘드리아/엽록체 식별 분자마커와 더불어 원형질체 callus의 선발에 분자마커로서 활용하였다.

8. 신규 융성불임 양배추 개발 및 특성 분석

유채/브로콜리/배추의 경우 분자마커를 통해 지속적으로 선발하여 신초 유도 및 발근 (rooting) 중에 있기 때문에 원예적 형질 검증에는 좀 더 시간이 필요한 실정이다. 그러나 양배추의 경우 2개 라인의 callus에서 총 8개체의 원형질체 융합 식물체를 생산하여 화기 구조 및 원예적 형질을 검증 할 수 있었다.

발근(rooting)까지 거쳐 순화된 원형질체 융합 양배추 식물체는 온실에서 재배하였다. 양배추의 특성상 개화를 시키려면 일정 크기의 구가 형성될 때까지 키운 후 저온처리를 해야 개화가 진행되기 때문에 유도 상태의 원형질체 융합 양배추를 일정 기간 재배한 후 60일 가량 인공적으로 저온처리(7℃)를 하였다. 확보된 8개체의 원형질체 융합 양배추는 모두 DCGMS의 미토콘드리아와 양배추의 엽록체를 가지고 있다. 또한 융성불임 후보 유전자인 *orf463* 유전자를 모두 가지고 있는 cybrid 식물체이다. 8개의 cybrid 양배추는 약 60일간의 저온 처리에도 불구하고 저온황화 등과 같은 현상은 보이지 않았고, 정상적인 생육을 하였다. 이들 8개체 중에서 2개체는 현재 개화되어 화기를 관찰 할 수 있었고, 개화 된 2개체는 모두 융성불임성을 보였다. 즉 DCGMS와 양배추의 원형질체 융합을 통해 생산된 식물체의 수술은 꽃 발달 초기(stage 1)부터 수술 발달에 이상이 있었고, 꽃 발달 후기(stage 5)에서도 정상적인 양배추 화기와는 전혀 다르게 수술이 퇴화된 모습을 보였다. 확인된 융성불임 cybrid 식물체는 정상 양배추와의 교배를 통해 종자까지 얻을 수 있었는데, 이는 수술은 퇴화되었지만 암술의 기능은 정상적이라는 것을 확인 할 수 있는 결과였다.

이와 같은 결과로 DCGMS 융성불임성을 양배추에 전이시켜 육종에 활용 가능한 새로운 융성불임 양배추 자원을 개발하는데 성공하였다. 신규 융성불임 양배추로 확인된 식물체의 callus는 2013년 2월 5일자로 한국 생명공학 연구원 유전자 은행에 기탁 하였다(기탁번호: KCTC 12365BP).

9. 십자화과 유전자원 수집 및 특성 분석

본 연구에서는 원형질체 융합을 통해 생산된 융성불임 식물체의 조기 상용화를 위해 국내/해외 육종자원 수집 및 특성평가를 실시하였다. 또한 특성 평가를 통해 선발된 유전자원은 융성불임 식물체가 생산되었을 때 교배친으로 활용하고자 하였다. 유전자원에 대한 특성 평가는 1년차와 2년차에 집중적으로 실시를 하여 미리 교배친으로 사용할 육종 자원을 선발하고, 융성불임 식물체가 확보 되면 식물체 유지 및 계통 고정을 위해 활용하고자 하였다. 결과적으로 중국에서 수집한 총 26종의 유채 유전자원과 23종의 양배추 유전자원에 대한 원예적 특성 검정을 실시하였다. 또한 그 중 가장 우수한 형질을 보이는 10종의 유채 유전자원과 2종의 양배추 유전자원을 한국생명공학연구원 유전자원 센터에 기탁하였다.

V. 연구성과 및 성과 활용 계획

1. 신규 옹성불임 cybrid 양배추 식물체 활용 계획

양배추의 세계 총 재배면적은 2,084천 ha이고, 중국이 약 70만 ha로 가장 크며, 인도(20만 ha)와 유럽(20만 ha) 순으로 재배면적이 높다. 중국의 경우 양배추 종자 가격은 약 100불/kg 수준이나 일부 고순도/고품질의 종자의 경우 2,000불/kg까지도 가격이 형성 되어있어, 제품 경쟁력이 부가가치에 매우 큰 영향을 준다. 그러나 양배추의 경우에는 자가불화합이 매우 약해 고순도의 F₁종자 생산이 매우 어려운 실정이다. 따라서 본 연구 과제를 통해 개발된 신규 옹성 불임 cybrid 양배추 육종자원은 고순도/고품질 양배추 F₁ 종자 생산을 위한 육종의 소재로 직접적인 활용이 가능하여 현재까지 경쟁력을 가지 못했던 양배추 종자 시장의 국제 경쟁력을 확보 할 수 있는 계기가 될 것이다. 특히 본 과제를 통해 개발된 신규 옹성불임 cybrid 양배추 육종 자원과 내병성(위황병, 뿌리혹병, 흑부병 등) 육종 기술을 접목하여 고순도 내병성 양배추 품종을 개발한다면 고부가가치 신품종 개발이 가능할 것으로 예상된다.

이를 위해 현재 확보된 신규 옹성불임 cybrid 양배추 식물체에 대한 특허 출원을 진행 중에 있으며, 향후 국제 특허까지 획득 할 예정이다. 또한 양배추 골든씨드 프로젝트 과제에 적극 활용하여 수출용 신품종 개발에 활용 하고자 한다. 보다 구체적으로는 1차적으로 중국 시장을 목표로 조생계 흑부병/위황병 저항성 품종개발에 본 연구의 신규 옹성불임 cybrid 양배추 육종 자원을 활용할 계획이며, 보다 많은 계통 육성을 통해 2차적으로 유럽/인도 등에 적합한 신품종 육성에도 활용할 계획이다.

2. 십자화과 옹성불임 식물체 라인 활용계획(배추/유채/브로콜리)

배추/유채/브로콜리의 경우 본 과제를 통해 옹성불임 식물체까지 확인은 하지 못하였지만, 현재 분자마커로 검증된 cybrid 식물체가 생산되고 있는 단계이기 때문에 빠른 시일 내에 옹성불임 식물체가 확보될 수 있을 것으로 예상된다. 브로콜리의 경우 현재 원형질체 융합을 통해서도 식물체가 확보되고 있지만, 신규 옹성불임 cybrid 양배추와의 교배를 통한 옹성불임 브로콜리 육종 자원 생산이 가능하다. 따라서 신규 옹성불임 브로콜리 개발과 신품종 개발에 충분히 활용할 수 있을 것으로 예상된다. 또한 배추의 경우에는 아직까지 옹성불임을 이용한 상용화된 F₁ 종자가 없기 때문에 본 과제를 통해 확보 되는 옹성불임 배추 육종 자원을 최대한 신속히 품종 개발과 연계 시켜 고부가가치 품종 개발에 있어 경쟁 우위를 갖고자 한다. 배추 또한 골든씨드 프로젝트와 연계를 통해 중국/인도 수출용 신품종 개발에 적극 활용하고자 한

다.

유채는 전 세계 종자 시장 규모가 2조가 넘는 글로벌 작물로 엄청난 잠재력을 가진 작물이나 국내 품종 개발 기술 수준은 매우 저조한 실정이다. 유채의 경우에는 옹성불임성을 이용하여 F₁ 종자를 생산하고자 할 시에 옹성불임 자원과 더불어 옹성불임을 회복시키는 회복친 개발이 추가적으로 필요하기 때문에 옹성불임 채종 시스템 개발이 전 세계적으로도 매우 어려운 실정이다. 즉 유채의 옹성불임 채종 시스템 개발에 대한 기술 가치는 매우 크나 높은 기술적 장벽을 갖는다고 할 수 있다. 본 연구에서는 분자마커로 검증된 신규 cybrid 유채 식물체를 생산하였고, 현재 전남대학교에서 차세대바이오그린 21과제로 DCGMS 옹성불임 회복 유전자 클로닝이 진행되고 있다. 따라서 향후 두 과제의 결과를 융합한다면 빠른 시일 내에 유채 옹성불임 채종 시스템을 완성하여 유채 품종 개발에 국제 경쟁력을 갖출 수 있을 것을 예상된다.

3 옹성불임 식물체 개발 기술 활용계획

본 연구 개발에 사용되는 무 옹성불임자원(DCGMS)와 비대칭 융합기술을 이용한 중간교잡 식물체 생산기술의 개발은 독창적인 육종 시스템이므로 이를 십자화과 식물에 적용함으로써 독자적인 지적 재산을 확보하게 되고 종자 산업의 국가 경쟁력을 향상에 기여할 것이다. 또한 본 연구과제에서 확립된 비대칭 원형질체융합 기술은 십자화과 채소작물은 물론 현재 신 품종 종자 개발을 위해 다양한 연구가 진행되고 있는 식량작물이나 원예작물에도 쉽게 기술전이가 가능하여 작물 신 품종 개발 기술로서 효과적으로 응용이 가능할 것이다.

4. Cybrid callus 조기 식별 시스템

본 연구 개발에 사용된 Cybrid callus 조기 식별 시스템은 전통적인 원형질체 융합 기술과 분자마커의 접목으로 단기간 내에 원하는 형질의 옹성불임 자원을 개발 할 수 있는 기술로서, 본 연구 대상 뿐만 아니라 다양한 대상의 원형질체 융합 기술에도 응용이 가능하다. 따라서 유사 연구를 진행 중인 국내 연구팀에게 실험 방법 및 기술 이전을 통해 타 연구의 효율화에 활용 예정이다.

5. Cybrid 식물체 분석 및 세포질 융합 패턴 분석

본 연구를 통해 세포질 불활성화처리가 이루어진다 하더라도 개발된 식물체 라인별로 donor와 recipient 간의 세포질 유전자(엽록체 및 미토콘드리아)의 조합 패턴이 다양함을 알 수 있었다. 이 결과는 세포질 유전자의 혼합에 따라 유전자 수준에서 이들 사이에 상호 경쟁을 통한 특정한 유전자 패턴의 우점 기작이 존재함을 나타내는 것으로 세포질 유전자의 상호 경쟁

및 우점에 관련된 진화생물학적 연구 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

아울러 genomic DNAs 시료로부터 적외선분광 스펙트럼 분석을 통한 cybrid 식물체 식별체계 및 십자화과 생물종 사이의 식별 패턴은 생물종 genome의 구조적 특성 분석은 물론 진화적 측면을 연구할 수 있는 새로운 단서를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

SUMMARY

A cybrid plant is a type of hybrid plant that combines the nuclear genome from one recipient species with the cytoplasmic genome (mitochondria and chloroplast) from a donor plant species. Cybrid plants can be produced using protoplast fusion technology. Using this technology, it is possible to elucidate the genetic contribution of the cytoplasmic genome apart from that of the nuclear genome. As important agronomical characteristics such as cytoplasmic male sterility (CMS) are controlled by the cytoplasmic genome, CMS cybrids are valuable resources in the agronomic seed industry. Cybrid plants, especially CMS cybrids, can also be produced using donor–recipient asymmetric protoplast fusion technologies.

Cruciferae is one of the most important vegetables in the world. Recently the world market of F₁ hybrid seed industry is significantly enlarged. In order to protect domestic seed industry, many countries are trying to possess these CMS cybrid technologies. The development of CMS cybrid technologies play key role in becoming a winner in global seed market. Therefore this research aims to develop core technologies for production of CMS cybrid plant from Cruciferae plants. To accomplish these goals, first of all we collected plant materials including CMS donor plant (radish from Dongbu company) and recipient Cruciferae plants (cabbage, rapeseed, broccoli, and chinese cabbage). Secondly, we established the efficient protoplast isolation and asymmetric protoplast fusion system from these plants. Thirdly, we established the plant regeneration system from fused protoplast of each CMS donor and recipient Cruciferae plants (cabbage, rapeseed, broccoli, and chinese cabbage). In addition, chloroplast–based markers and mitochondria–based markers, *orf463* markers that distinguish cytoplasm of DCGMS were used for selection of callus by protoplast fusion. Also, we developed the rapid discrimination system of cybridity and hybridity between Cruciferae plants using FT–IR spectroscopy combined by multivariate analysis.

Thus, we obtained 2 cybrid plants(cabbage), containing DCGMS–mitochondrial genome and cabbage–chloroplast genome. Both cybrid plants had short stamens with undeveloped anthers. Whereas, these cybrids set seeds when pollinated with female–fertile cabbage, and this results indicate that the female–fertility of cybrid plants are normal. Therefore, these

cybrids may be useful for production of F1 hybrid seed in cabbage. Furthermore, CMS cybrid technologies established in this research could be applied for the development of CMS line from other crops and horticultural plants. In addition, the rapid and reliable discrimination system shown in this research could be applied as a novel tool for F1 hybrid and cybrid plant selection.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	21
Chapter 2. Research Situations	22
Chapter 3. Methods and Results	27
Section I.	
Development of chloroplast-based markers and mitochondria-based markers for distinguish cybrid callus	27
Section II.	
Collection of plant materials (radish/cabbage/rapeseed/broccoli/chinese cabbage) and establishment of protoplast isolation system	35
Section III.	
Development of plant regeneration system from protoplast culture of Cruciferae plants (cabbage/rapeseed/broccoli/chinese cabbage)	44
Section IV.	
Development of asymmetric protoplast fusion system between donor and recipient plants (cabbage/rapeseed/broccoli/chinese cabbage)	51
Section V.	
Development of CMS cybrid plants from protoplast culture of recipient plants (cabbage/rapeseed/broccoli/chinese cabbage)	69
Section VI.	
Development of rapid discrimination system for CMS cybrid plants using FT-IR spectroscopy	91

Section VII.	
Screening of a candidate gene responsible for cytoplasmic male sterility containing DCGMS cytoplasm -----	103
Section VIII.	
Development and characterization of a novel cytoplasmic male-sterility cabbage -----	110
Section IX.	
Collection and evaluation of Cruciferae germplasm -----	115
Chapter 4. Achievement and Contributions -----	120
Chapter 5. Applications -----	127
Chapter 6. International Research Information -----	132
Chapter 7. References -----	133

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황	22
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	27
제 1 절.	원형질체 융합 callus 조기 판별 분자마커 시스템 개발	27
1.	십자화과 미토콘드리아 식별 분자마커 시스템 개발	
2.	십자화과 엽록체 식별 분자마커 시스템 개발	
제 2 절.	무/양배추/유채/브로콜리/배추 자원 확보 및 원형질체 분리체계 확립	35
1.	무응성불임(DCGMS) 라인 확보 및 원형질체 분리체계 확립	
가.	식물재료의 발아율 검정	
나.	무 응성불임(DCGMS) 라인 확보 및 기내 배양체계 확립	
다.	무 자엽 및 배측으로부터 원형질체 분리 조건 확립	
2.	유채/배추/브로콜리/양배추의 기내배양 및 원형질체 분리 조건 확립	
가.	유채 원형질체 분리 및 배양체계 확립	
나.	배추 원형질체 분리 및 배양체계 확립	
다.	브로콜리 원형질체 분리 및 배양체계 확립	
라.	양배추 원형질체 분리 및 배양체계 확립	
마.	원형질체 분리 효율 증대	
제 3 절.	양배추/유채/브로콜리/배추 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립	44
1.	양배추 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립	
2.	유채 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립	
3.	브로콜리 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립	
4.	배추 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립	
제 4 절.	Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체 융합체계 확립	51

1. 무 원형질체의 핵 불활성화 체계 확립
2. 양배추/유채/브로콜리/배추 원형질체의 세포질 불활성화 체계 확립
 - 가. 양배추 원형질체의 세포질 불활성화 조건 확립
 - 나. 유채 원형질체의 세포질 불활성화 조건 확립
 - 다. 브로콜리 원형질체의 세포질 불활성화 조건 확립
 - 라. 배추 원형질체의 세포질 불활성화 조건 확립
3. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 융합체계 확립
 - 가. 무와 양배추 원형질체의 융합체계 확립
 - 나. 무와 유채 원형질체의 융합체계 확립
 - 다. 무와 브로콜리 원형질체의 융합체계 확립
 - 라. 무와 배추 원형질체의 융합체계 확립
4. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 융합 효율 증대
 - 가. 무와 양배추 원형질체의 융합 효율 증대
 - 나. 무와 유채 원형질체의 융합 효율 증대
 - 다. 무와 브로콜리 원형질체의 융합 효율 증대
 - 라. 무와 배추 원형질체의 융합 효율 증대

제 5 절. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 융합 원형질체로부터

cybrid 식물체 재생 기술 개발-----69

1. 무와 양배추 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발
2. 무와 유채 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발
3. 무와 브로콜리 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발
4. 무와 배추 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발
5. Donor(무) 와 recipient(양배추/유채) 융합 원형질체로부터 식물체 재생 효율 증대
 - 가. 무와 양배추 융합 원형질체의 식물체 재생 효율 증대
 - 나. 무와 유채 융합 원형질체의 식물체 재생 효율 증대

제 6 절. FT-IR 분광분석을 통한 hybrid, cybrid 식물체 판별 기술 개발-----91

1. Genomic DNA 적외선 분광분석을 통한 비대칭융합 cybrid 식별 체계 확립
2. Genomic DNA 적외선 분광분석을 통한 무와 양배추 hybrid 식별 기술 개발
3. Genomic DNA의 FT-IR 분광 분석을 통한 배추, 양배추 그리고 유채의 식별 기술 개발

제 7 절. DCGMS 융성불임 후보 유전자 탐색-----	103
1. 무의 short repeat sequence 분석	
2. DCGMS 융성불임 후보 유전자 탐색 및 유전자 분석	
제 8 절. 신규 융성불임 양배추 개발 및 특성 분석 -----	110
제 9 절. 십자화과 유전자원 수집 및 특성 분석 -----	115
1. 해외 유채 유전자원 수집 및 유전자원 기탁	
2. 해외 양배추 유전자원 수집 및 유전자원 기탁	
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도 -----	120
제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용 계획 -----	127
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	132
제 7 장 참고문헌-----	133

제 1 장 연구개발과제의 개요

○ 채소류 중에서도 무, 배추, 양배추, 브로컬리, 유채 등이 속해있는 십자화과 채소류는 우리나라는 물론 세계적으로 경제성이 매우 큰 채소 종자이다.

○ 세계 채소종자 시장은 5.14조원('12년)이며, 십자화과 작물 중 배추, 브로컬리, 컬리플라워 종자 시장은(양) 4,000억원 규모이며, 유채의 세계 종자시장 규모가 5,000억원 수준이다. 지역별로 인접한 중국의 십자화과 종자 시장규모를 살펴보면, 유채는 1,360억원, 양배추는 1,000억원, 배추는 950억원 수준 이다(몬산토 2007 Annual Report/중국 채소산업의 발전과 시사점).

○ 최근 중국, 인도 등 아시아권 국가들의 F1 종자 시장이 급속하게 성장하고 있는 추세이고, 일부 다국적 종묘회사가 경쟁적으로 시장 진출을 모색하고 있음.

○ 현재 십자화과 채소작물의 육종은 옹성불임자원(CMS) 중심으로 이루어지고 있음. 따라서 옹성불임 기반 육종기술 보유 여부에 의해 채소시장 종자 수출 경쟁력이 결정될 수 있음. 현재 상업적으로 이용되고 있는 십자화과 옹성불임 자원은 1962년 무에서 개발된 Ogura 옹성불임자원을 다른 십자화과 작물(양배추, 브로콜리, 청경채, 배추, 유채 등)에 도입한 자원임.

○ 십자화과 채소 작물중에서 자가불화합과 옹성불임성을 이용한 F1 종자 육성기술은 국내 종자회사가 세계적인 수준임. 그러나 Ogura 옹성불임을 도입한 십자화과를 육종에 이용하기 위해서는 복잡한 특허문제와 높은 로얄티 지불 문제로 인해 일부 다국적 종묘회사 이외에는 육종에 사용을 못하고 있는 상황임

○ 2007년 동부팜한농에서는 Ogura 옹성불임자원과는 다른 신규 무 옹성불임 자원(Dongbu-Cytoplasmic male sterility; DCGMS) 개발하고, 이들의 임성 회복에는 단일유전자가 관여한다는 것을 밝힘(특허출원번호: 10-2008-0031591 논문: *Theor. Appl. Genet.* (2008) 117:905-913).

○ 따라서 무 옹성불임자원(DCGMS)을 원형질체 융합 기술을 통해 십자화과(양배추, 유채, 브로컬리등)에 도입하면 Ogura 특허를 회피한 십자화과 옹성불임 육종재료를 확보할 수 있음.

○ 현재까지 원형질체 융합을 통해 200여종 이상의 중간 또는 종내 교잡이 가능한 것으로 보고되고 있으며 여러 작물에서 비대칭원형질체 융합을 통해 CMS hybrids 또는 cybrids 생산이 가능한 것으로 알려져 있음.

○ 중간 교잡인 cybrids 제조 방식은 다양한 기술을 활용하여야 하며 신규 제조 특허가 다수 있음.

○ DCGMS 자원과 원형질체 융합 기술을 이용해 우수한 육종 소재를 많이 만들 수 있다면 세계적 수준인 국내 종묘회사의 채소육종 기술과 더불어 고품질/고순도 신품종 육성이 가능할 뿐 만 아니라 신품종 육성 기간을 획기적으로 단축시킬 수 있음.

○ 또한, 본 과제를 통해 신규 융성불임 십자화과 자원을 개발한다면 채소 종자 시장의 국제적 경쟁력 확보뿐 아니라 유채와 같은 산업용 작물에도 적용 가능하여 바이오 디젤을 비롯한 에너지 산업에도 활용 가능한 원천 기술 확보가 가능할 것임.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 본 연구 관련 국내외 기술수준 비교

○ 상업적으로 이용 가능한 십자화과 융성불임자원은 Ogura CGMS로 제한되어 있기 때문에 무 Ogura 융성불임성을 타 작물로 도입하려는 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있음. 특히 지난 30년 동안 프랑스 INRA 연구소, 일본 Plantech Research Institute, 미국 Cornell University, 캐나다 McGill University를 중심으로 Ogura 융성불임 십자화과 작물 개발 연구가 경쟁적으로 진행되고 있음. 특히 프랑스 국가농업연구소(INRA)에서 무 Ogura 융성불임을 유지하는 유전자와 융성불임을 회복하는 유전자를 세계 최초로 클로닝하여 원천기술을 확보한 상태이기 때문에 무 Ogura 융성불임을 도입한 십자화과 작물 개발의 경우 고가의 로얄티 지불 문제가 있기에 현재 다국적 기업 위주로 제한적으로 이용되고 있는 현실임. 특히 융성불임자원(CMS)을 이용하여 종자를 생산 또는 연구 중인 업체는 유럽 종자회사 및 대기업 종자회사를 중심으로(Nickerson Zwan, Clause/Tezier, Vilmoran, Enza Zaden, S&G Rijk Zwaan, Seminis, Sakata) 주로 십자화과(양배추, 브로콜리, 컬리플라워 등) 작물에 도입하고 있다. 융성불임자원

을 이용해 생산된 종자는 일반종자보다 2~3배 정도 높은 가격에 판매가 되고 있음.

○ 세포융합에 의한 양배추에의 옹성불임 도입방법 으로는 현재 까지 3 가지 방법이 (1) 무 세포질로부터의 Ogura, (2) 유채로 부터의 Polima, (3) 갓으로부터의 Anandro 진행되었음. 그러나 상업적으로 양배추류 일대잡종 육성에 직접 이용되고 있는 것은 Ogura 세포질에 의한 한 가지 뿐이다. 그러나 이 계통도 화기구조가 다소 기형적이라 매개충(벌)이 암술과 수술의 끝에 앉지 않고, 꽃의 옆구리에서 꿀을 따기 때문에 교잡이 잘 이루어지지 않는 실정임. 또한 분자유전학적인 방법에 의해 옹성불임성 인자를 합성하여 판매하는 회사가 있지만 비용이 너무 비싸 이용하기 어려운 문제가 있음. 옹성불임자원을 십자화과 작물에 도입하기 위해서 유럽 종자회사 및 대기업 종자회사에서 연구를 진행 중이거나 일부 작물에 대해서는 옹성불임자원을 이용하여 종자를 생산하고 있음. 옹성불임자원을 이용하여 생산된 종자는 일반종자 보다 2 배 이상 높은 가격에 판매가 되고 있음. 따라서 본 연구과제에서는 신규 옹성불임자원인 DCGMS를 양배추, 유채, 브로콜리 작물에 도입하여 옹성불임 자원을 개발하고, 고품질 작물의 신품종 개발 및 고순도 F1 종자를 생산하여 국내 및 수출품목으로 육성하고, Cybrid 세포주를 분별할 수 있는 분자마커와 생산기술을 특허 확보 후 라이선싱 할 계획임.

2. 본 연구관련 핵심 특허분석

개발기술명		원형질체 융합기술	웅성불임자원 개발
Keyword		Cytoplasmic male sterility Protoplast fusion	Brassica, cytoplasmic male sterility
검색건수		22	506
유효특허건수		17	15
핵심특허 및 관련성	특허명	Novel 'oxy' CMS brassica napus corrected for chlorosis using hexaploid bridging material generated through protoplast fusion and a method of producing the plant	DNA sequence imparting cytoplasmic male sterility, mitochondrial genome, nuclear genome, mitochondria and plant containing said sequence and process for the preparation of hybrids
	보유국	미국	프랑스
	등록년도	2003	1998
	관련성(%)	50%	40%
	유사점	원형질체 융합방법을 통해 CMS 특성 전이 유채 개발	무 웅성불임 자원
차이점	비대칭 원형질체융합이라는 새로운 기술이용	본 특허는 무 Ogura 웅성불임 자원에 대한 특허이나 본 과제는 당사 개발 무 웅성불임 자원(DCGMS)을 이용함	

3. 본 연구관련 논문분석

개발기술명		원형질체 융합기술	웅성불임자원 개발
Keyword		원형질체 융합기술	Cytoplasmic male sterility
검색건수		686	2,035
유효논문건수		57	50
핵심논문 및 관련성	논문명	Asymmetric somatic hybridization between UV-irradiated <i>Citrus unshiu</i> and <i>C. sinensis</i> : regeneration and characterization of hybrid shoots	Development of a molecular marker specific to a novel CMS line in radish (<i>Raphanus sativus</i> L.)
	학술지명	Plant Cell Reports	Theoretical and Applied Genetics
	저자	Xu XY, Hu ZY, Li JF, Liu JH, Deng XX	NAHM Seok-Hyeon
	게재년도	2007	2005
	관련성(%)	50%	70%
	유사점	UV로 donor 식물체의 핵을 불활성화 시킨 후 비대칭 원형질체 융합 시도함	무에서 Ogura 이외의 신규 무 웅성불임 자원을 개발하였다는 점에서 유사함
차이점	식물 원형질체 융합에서는 아직 artificial cytoplasm fusion 이라는 새로운 방법을 식물 원형질체 융합에 이용.	NWB 웅성불임 자원은 웅성불임 회복 라인이 없는 완벽한 CMS 자원이므로 엽근채류에만 이용이 가능함.	

4. 본 연구관련 제품 및 시장 분석

○ 국내에 재배되는 고추는 대부분 웅성불임을 이용하여 채종한 일대잡종임. 고추에서는 핵 유전형과 세포질형의 웅성불임성이 모두 이용되고 있음. 십자화과 채소의 보급 품종은 1대 잡종이며 그 채종은 주로 자가불화합성을 이용하여 왔는데, 이 방법은 잡종 순도가 나빠지는 문제점이 나타남. 이러한 문제점을 해결하기 위해 최근 동부기술원에서 개발된 무 신규웅성불임 자원(DCGMS 타입)을 육종라인에 도입하기 위한 연구를 추진하고자 함. 현재 국내 채소종자 시장은 1,600억원('07) 수준이며, 이 중 십자화과 작물인 배추는 약 140억원('07), 양배추는 34억원('07) 수준임(한국종묘협회).

○ 자가불화합성을 이용하여 개발된 F1 일대잡종 품종은 종자 순도에 문제가 있기 때문에 고순도 F1 종자를 개발하기 위해서는 웅성불임성을 도입이 필수적임. 따라서 원형질체융합을 이용한 웅성불임성의 도입은 기존 관행육종법으로는 개발이 어렵거나 불가능에 가까운 우수 품종의 개발을 가능하게 하므로 종자업체에 큰 경제적 이익을 제공함. 현재 동부기술원에서 개발한 무 웅성불임자원(DCGMS)은 자가불화합성이 약하고, 웅성불임 자원이 존재하지 않는 양배추, 배추, 유채, 브로콜리와 같은 십자화과 작물에 도입이 가능하며, 이 경우 고품질 신품종 개발, 고순도 F1 종자 생산, 신품종 개발 기간 단축을 통한 생산비 절감 효과, 신품종에 대한 품종보호, 그리고 로열티 수입을 비롯한 큰 경제적 효과를 가져 올 수 있음.

○ 기존 특허는 Ogura 웅성불임 자원을 이용한 신규 십자화과 자원 개발 분야에 치중되어 있고 Ogura 웅성불임 자원에 관한 많은 특허가 이미 있기 때문에 Ogura 웅성불임 자원 이용 시 많은 로열티가 발생함. 따라서 본 연구과제에서는 동부하이텍이 자체 개발한 무 웅성불임 자원(DCGMS)를 이용하여 신규 양배추, 유채, 브로콜리 웅성불임 자원을 개발하고자 하며, 개발될 양배추, 유채, 브로콜리 웅성불임 신규자원 특허 및 제조 방법 등의 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획이고 이를 통해 신품종을 시장에 출시할 것임.

○ 기존 논문은 Ogura 와 웅성불임이 불안정한 polima, nap 등의 웅성불임 자원에 대한 특성 분석과 이들 자원을 이용한 신규 웅성불임 자원 개발 분야에 치중되어 있음. 하지만, 본 연구과제는 동부하이텍이 개발한 무 웅성불임 자원을 양배추, 유채, 브로콜리에 확대 적용하는 방향으로 연구를 추진하여 연구 결과를 국제 SCI급 학술지에 게재할 수 있을뿐만 아니라 세계적으로 새로운 자원을 이용한 십자화과 작물의 개발에 관한 새로운 육종기술 개발이 가능함.

○ 현재 양배추의 경우 Ogura 옹성불임성을 이용하여 F1종자를 생산하고 판매가 이루어지고 있으나, 막대한 로열티로 인해 일부 다국적 종자 회사 이외에는 사용을 못하고 있음. 특허권 문제로 국내 종묘회사에서는 단 한곳도 Ogura 옹성불임성을 이용한 F1 양배추를 생산/판매 할 수가 없음. 따라서 국내 자체 기술로 신규 옹성불임 양배추, 유채, 브로콜리를 개발하면 국내 뿐 아니라 중국/인도 시장에 적극 진출할 계기가 될 수 있음. 비대칭 융합 세포제조에 관한 새로운 기술을 확보하여 이를 DCGMS 세포와 set로 원하는 육종자원에 이식해 주는 상업화를 할 계획임. 즉 신규한 유전형질을 다른 종묘회사(유럽, 미국에 있으며 국내기업과는 시장 충돌이 일어나지 않는 종묘회사)을 상대로 자원과 기술을 묶은 Bundle 방식의 사업화를 추진할 수 있음.

○ 자가불화합성을 이용하여 개발 된 F1 일대잡종 품종은 종자 순도에 문제가 있기 때문에 고순도 F1 종자를 개발하기 위해서는 옹성불임성을 도입이 필수적임. 따라서 원형질체융합을 이용한 옹성불임성의 도입은 기존 관행육종법으로는 개발이 어렵거나 불가능에 가까운 우수 품종의 개발을 가능하게 하므로 종자업체에 큰 경제적 이익을 제공함. 현재 동부기술원에서 개발한 무 옹성불임자원(DCGMS) 은 자가불화합성이 약하고, 옹성불임 자원이 존재하지 않는 양배추, 배추, 유채, 브로콜리와 같은 십자화과 작물에 도입이 가능하며, 이 경우 고품질 신품종 개발, 고순도 F1 종자 생산, 신품종 개발 기간 단축을 통한 생산비 절감 효과, 신품종에 대한 품종보호, 그리고 로열티 수입을 비롯한 큰 경제적 효과를 가져 올 수 있음.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 원형질체 융합 callus 조기 판별 분자마커 시스템 개발

DCGMS 융성불임자원은 무에서 개발 되었지만 원형질체 융합을 통해 다른 십자화과 작물로 융성불임성 전이가 가능하다. 하지만 이는 많은 시간과 노력이 필요하고 원형질체 융합을 통해 생산 된 식물체(cybrid plant)가 원하는 융성불임 형질을 갖는 비율이 극히 낮다. 전통적인 원형질체 융합 기술을 이용한 융성불임성 전이는 원형질체 융합 효율을 높여 식물체를 대량으로 생산하고, 많은 시간과 노력을 투입하여 대규모 포장 검정을 통해 육종에 활용할 될 수 있는 식물체를 선발하는 과정으로 진행 해왔다. 따라서 선발 효율이 매우 낮은 문제점이 있었고, 또한 원형질체 융합 식물체가 선발되어도 육종 활용에 힘든 여러 가지 문제점들이 알려져 있다. 기존에 알려진 융성불임 형질의 원형질체 융합에서 가장 문제가 되는 것은 원형질체 융합 식물체의 저온황화 현상, 꿀샘 미발달 및 초세의 약화 등이다. 이것은 원형질체 융합 시 doner 식물체의 미토콘드리아만 recipient 식물체에 전이되어야 하는데 엽록체까지 함께 전이되어 recipient 식물체의 핵과 부조화 현상이 일어나기 때문인 것으로 보고 된 바가 있다(Pelletier et al., 1983).

본 연구에서는 기존에 통상적으로 해오던 원형질체 융합 기술을 벗어나 분자마커의 접목으로 보다 효율적인 연구를 진행하고자 하였다. 즉 원형질체 융합 callus 단계에서 분자마커를 이용하여 조기에 원형질체 융합 여부를 판단해 원형질체 융합이 되지 못한 callus는 도태시키고, 원형질체 융합이 된 callus에서도 DCGMS의 미토콘드리아만 전이되고 엽록체는 recipient의 엽록체를 가진 callus를 선발하여 식물체를 얻고자 하였다(그림 1-1).

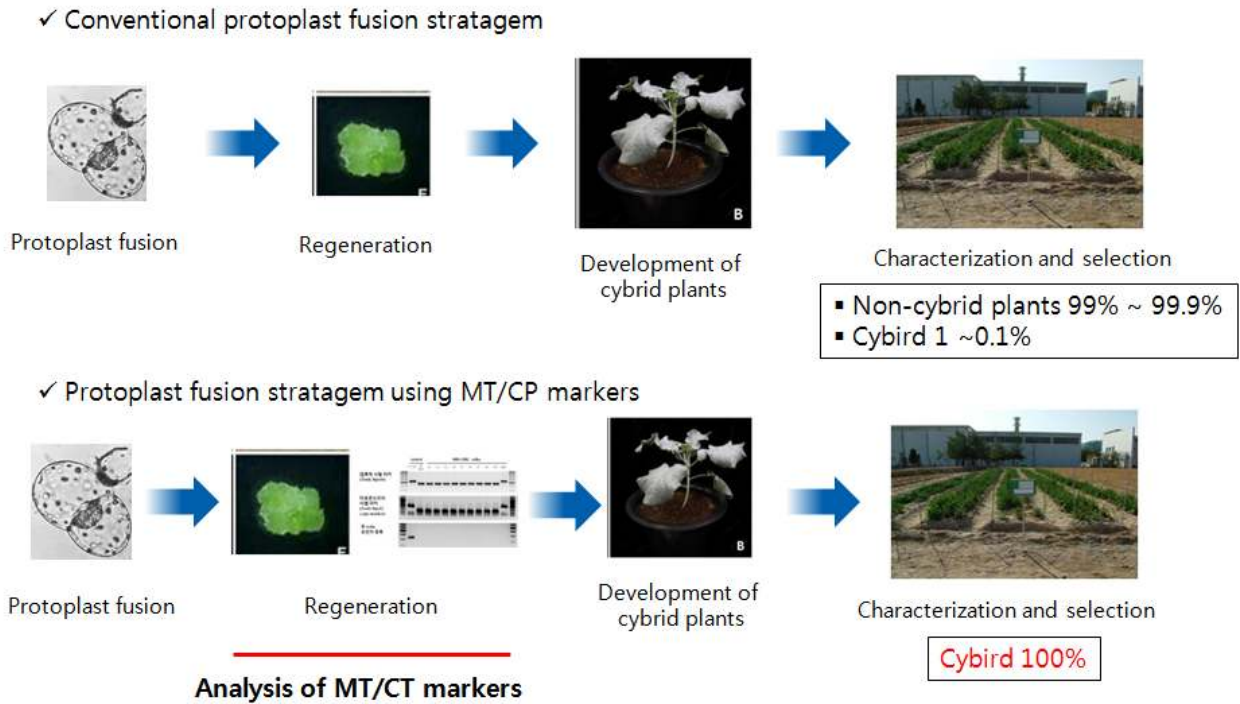


그림 1-1. 미토콘드리아 및 엽록체 식별 분자마커를 이용한 고효율 연구 개발 전략.

1. 십자화과 미토콘드리아 식별 분자마커 시스템 개발

본 연구에서는 다양한 십자화과 작물에서 DCGMS의 미토콘드리아를 확인할 수 있는 분자마커들을 개발하고자 무(DCGMS) 이외의 십자화과 작물(양배추, 브로콜리, 유채, 배추)의 미토콘드리아 DNA 다형성 분석을 실시하였다. 다형성 분석은 미토콘드리아 유전자 coding region에서 프라이머를 제작하여 intergenic region의 다형성을 탐색하였다. 결과적으로 총 5개의 DCGMS 미토콘드리아를 식별할 수 있는 분자마커를 개발하였다. 먼저 *ccmc* 유전자와 *Nad2* 유전자의 intergenic region에서 DCGMS에서만 특이적인 224bp의 in/del을 확인 할 수 있었다. 이를 MT-1 마커라 명명하였다(그림 1-2). 그리고 *rps4* 유전자와 *Nad7* 유전자의 intergenic region에서는 DCGMS에서만 24bp가 결실되어 있는 부분을 찾아낼 수 있었고, 이를 MT-2 마커라 명명하였다(그림 1-3). *Nad1* 유전자와 *orf122* 유전자의 intergenic region에서도 DCGMS에서만 36bp가 삽입된 부분을 찾아낼 수 있었고, 이를 MT-3 마커라 명명하였다(그림 1-4). *TrnY* 유전자와 *TrnD* 유전자의 intergenic region에서는 무/배추/유채에서만 31bp가 결실된 부분이 발견되었고, 이를 MT-4 마커라 명명하였다(그림 1-5). MT-4 마커는 무 및 양배추, 브로콜리 cybrid callus 판별에만 사용할 수 있는 마커이다. *TrnM* 유전자와 *Atp4* 유전자의 intergenic region에서는 무에서만 29bp가 삽입된 부분을 찾아 낼 수 있었고, 이를 MT-5 마커라 명명하였다(그림 1-6).

C. Cabbage	TAAGAAGGTCAGAGTCACAATCGCTTTCTCAATTGACACTGCGCCAGAATCTACCACCCC
Rape	TAAGAAGGTCAGAGTCACAATCGCTTTCTCAATTGACACTGCGCCAGAATCTACCACCCC
Broccoli	TAAGAAGGTCAGAGTCACAATCGCTTTCTCAATTGACACTGCGCCAGAATCTACCACCCC
Radish	TAAGAAGGTCAGAGTCACAATCGCTTTCTCAATTGACACG-----
Cabbage	TAAGAAGGTCAGAGTCACAATCGCTTTCTCAATTGACACTGCGCCAGAATCTACCACCCC

C. Cabbage	ATTCAITGACTATCTCACCTCACCTCCAATGGGTCTGGGCGCTTAGCAGCCCCTACTTTTC
Rape	ATTCAITGACTATCTCACCTCACCTCCAATGGGTCTGGGCGCTTAGCAGCCCCTACTTTTC
Broccoli	ATTCAITGACTATCTCACCTCACCTCCAATGGGTCTGGGCGCTTAGCAGCCCCTACTTTTC
Radish	-----
Cabbage	ATTCAITGACTATCTCACCTCACCTCCAATGGGTCTGGGCGCTTAGCAGCCCCTACTTTTC
C. Cabbage	ACATTTCTTCCCTATGAAACTACTTGGTCTACTTCCATTAGACTGAGATGGCGTCTTTTT
Rape	ACATTTCTTCCCTATGAAACTACTTGGTCTACTTCCATTAGACTGAGATGGCGTCTTTTT
Broccoli	ACATTTCTTCCCTATGAAACTACTTGGTCTACTTCCATTAGACTGAGATGGCGTCTTTTT
Radish	-----
Cabbage	ACATTTCTTCCCTATGAAACTACTTGGTCTACTTCCATTAGACTGAGATGGCGTCTTTTT
C. Cabbage	CGACGGATTGATCCGGACTTCCCACCTTCAACACTCGCAGGAAAGAAAAGACCAGAATCC
Rape	CGACGGATTGATCCGGACTTCCCACCTTCAACACTCGCAGGAAAGAAAAGACCAGAATCC
Broccoli	CGACGGATTGATCCGGACTTCCCACCTTCAACACTCGCAGGAAAGAAAAGACCAGAATCC
Radish	-----
Cabbage	CGACGGATTGATCCGGACTTCCCACCTTCAACACTCGCAGGAAAGAAAAGACCAGAATCC
C. Cabbage	TACTGAAGCTGCTAACAGAGACTGAGCAGATATAG
Rape	TACTGAAGCTGCTAACAGAGACTGAGCAGATATAG
Broccoli	TACTGAAGCTGCTAACAGAGACTGAGCAGATATAG
Radish	-----AGCAGATATAG
Cabbage	TACTGAAGCTGCTAACAGAGACTGAGCAGATATAG

그림 1-2. 무(DCGMS), 양배추, 유채, 브로콜리, 배추의 미토콘드리아에서 *ccmc/Nad2* intergenic region 염기서열 분석.

C. Cabbage	CTTCCACGATAAATCTATATTTTTCTTAAGAAAGAAGACTAGAATATCAITGGGAGTGC
Rape	CTTCCACGATAAATCTATATTTTTCTTAAGAAAGAAGACTAGAATATCAITGGGAGTGC
Broccoli	CTTCCACGATAAATCTATATTTTTCTTAAGAAAGAAGACTAGAATATCAITGGGAGTGC
Radish	CTTCCACGATAAATCTATATTTTTCTTAAGAAAGAAGACTAGAATATCAITGGGAGTGC
Cabbage	TTTTCCACGATAAATCTATATTTTTCTTAAGAAAGAAGACTAGAATATCAITGGGAGTGC

C. Cabbage	ACTTAAGCCAATTGGAGTACTAGGCCTTCTGTTCAGTGACAGTTATAGAAAAAAGCGA
Rape	ACTTAAGCCAATTGGAGTACTAGGCCTTCTGTTCAGTGACAGTTATAGAAAAAAGCGA
Broccoli	ACTTAAGCCAATTGGAGTACTAGGCCTTCTGTTCAGTGACAGTTATAGAAAAAAGCGA
Radish	ACTTAAGCCAATTGGAGTACTAGGCCTTCTGTTCAGTGACAGTTATAGAAAAAAGCGA
Cabbage	ACT-----TCTGTTCAGTGACAGTTATAGAAAAAAGCGA

C. Cabbage	AGCCCTCCACTCATAAGTAATAAGTAATTGAATTCCTTACCAGTCCGTCCTACCAGCTCT
Rape	AGCCCTCCACTCATAAGTAATAAGTAATTGAATTCCTTACCAGTCCGTCCTACCAGCTCT
Broccoli	AGCCCTCCACTCATAAGTAATAAGTAATTGAATTCCTTACCAGTCCGTCCTACCAGCTCT
Radish	AGCCCTCCACTCATAAGTAATAAGTAATTGAATTCCTTACCAGTCCGTCCTACCAGCTCT
Cabbage	AGCCCTCCACTCATAAGTAATAAGTAATTGAATTCCTTACCAGTCCGTCCTACCAGCTCT

C. Cabbage	TCTGTCTTCCTTTTTAAAAGGAGTTAACGATACGGATGTTCAAGCTTTGCCAGAAGCCTT
Rape	TCTGTCTTCCTTTTTAAAAGGAGTTAACGATACGGATGTTCAAGCTTTGCCAGAAGCCTT
Broccoli	TCTGTCTTCCTTTTTAAAAGGAGTTAACGATACGGATGTTCAAGCTTTGCCAGAAGCCTT
Radish	TCTGTCTTCCTTTTTAAAAGGAGTTAACGATACGGATGTTCAAGCTTTGCCAGAAGCCTT
Cabbage	TCTGTCTTCCTTTTTAAAAGGAGTTAACGATACGGATGTTCAAGCTTTGCCAGAAGCCTT

C. Cabbage	TTGCAGAGAGAAAAGT
Rape	TTGCAGAGAGAAAAGT
Broccoli	TTGCAGAGAGAAAAGT
Radish	TTGCAGAGAGAAAAGT
Cabbage	TTGCAGAGAGAAAAGT

그림 1-3. 무(DCGMS), 양배추, 유채, 브로콜리, 배추의 미토콘드리아에서 *rps4/Nad7* intergenic region 염기서열 분석.

C. Cabbage	ACGGAAAATCTCATTAACTTTAGTATTACAGACTTTTTACGAAGCGAGAGGAAAAGACGG
Rape	ACGGAAAATCTCATTAACTTTAGTATTACAGACTTTTTACGAAGCGAGAGGAAAAGACGG
Broccoli	ACGGAAAATCTCATTAACTTTAGTATTACAGACTTTTTACGAAGCGAGAGGAAAAGACGG
Radish	ACGGAAAATCTCATTAACTTTAGTATTACAGACTTTTTACGAAGCGAGAGGAAAAGACGG
Cabbage	ACGGAAAATCTCATTAACTTTAGTATTACAGACTTTTTACGAAGCGAGAGGAAAAGACGG

C. Cabbage	CAAAGTCTTAACTAAACCTGAAAGCCTAAAAAACGAACTTCCTTCAATGCCTTCTCAT
Rape	CAAAGTCTTAACTAAACCTGAAAGCCTAAAAAACGAACTTCCTTCAATGCCTTCTCAT
Broccoli	CAAAGTCTTAACTAAACCTGAAAGCCTAAAAAACGAACTTCCTTCAATGCCTTCTCAT
Radish	CAAAGTCTTAACTAAACCTGAAAGCCTAAAAAACGAACTTCCTTCAATGCCTTCTCAT
Cabbage	CAAAGTCTTAACTAAACCTGAAAGCCTAAAAAACGAACTTCCTTCAATGCCTTCTCAT

C. Cabbage	TAGTATCTGCTGTGTCGCTAAGCATTCTTTCCATCCGCTAATGGACCTATG-----C
Rape	TAGTATCTGCTGTGTCGCTAAGCATTCTTTCCATCCGCTAATGGACCTATG-----C
Broccoli	TAGTATCTGCTGTGTCGCTAAGCATTCTTTCCATCCGCTAATGGACCTATG-----C
Radish	TAGTATCTGCTGTGTCGCTAAGCATTCTTTCCATCCGCTAATGGACCTATG-----N
Cabbage	TAGTATCTGCTGTGTCGCTAAGCATTCTTTCCATCCGCTAATGGACCTCTTGATGCTCGA

C. Cabbage	TCGACCATCAACT-----CTGACATCCATAAGTAGATTAGGAGG-----C
Rape	TCGACCATCAACT-----CTGACATCCATAAGTAGATTAGGAGG-----C
Broccoli	TCGACCATCAACT-----CTGACATCCATAAGTAGATTAGGAGG-----C
Radish	TCGACCATCAACT-----CTGACATCCATAAGTAGATTAGGAGG-----C
Cabbage	CCAGCCATCAACCCGATCTGACTTTGATCCATAAGTAGATTCAATAGGAGGGTACCATCT
*..***** ** : *****...:*	
C. Cabbage	ATCTTCTTTTCCIT-----CAGCTCGCTTCGTC
Rape	ATCTTCTTTTCCIT-----CAGCTCGCTTCGTC
Broccoli	ATCTTCTTTTCCIT-----CAGCTCGCTTCGTC
Radish	ATCTTCTTTTCCIT-----CAGCTCGCTTCGTC
Cabbage	CGCTTCTTTTCCITTTGTACGTTCCAGCTCGCTTCGTC
. ***** *****	

그림 1-4. 무(DCGMS), 양배추, 유채, 브로콜리, 배추의 미토콘드리아에서 *Nad1/orf122* intergenic region 염기서열 분석.

C. Cabbage	GTTGTAGGTAGGGGCTTCATAGCTACTTTTCATTCTAAAGGAAAGCGAAGAACCAATCTTT
Rape	GTTGTAGGTAGGGGCTTCATAGCTACTTTTCATTCTAAAGGAAAGCGAAGAACCAATCTTT
Broccoli	GTTGTAGGTAGGGGCTTCATAGCTACTTTTCATTCTAAAGGAAAGCGAAGAACCAATCTTT
Radish	GTTGTAGGTAGGGGCTTCATAGCTACTTTTCATTCTAAAGGAAAGCGAAGAACCAATCTTT
Cabbage	GTTGTAGGTAGGGGCTTCATAGCTACTTTTCATTCTAAAGGAAAGCGAAGAACCAATCTTT

C. Cabbage	AGTCAATAGGAGCCCTACTTCCCAGGTATTTCTTACTCGACTAAAAGGAGAGGTTGTGA
Rape	AGTCAATAGGAGCCCTACTTCCCAGGTATTTCTTACTCGACTAAAAGGAGAGGTTGTGA
Broccoli	AGTCAATAGGAGCCCTACTTCCCAGGTATTTCTTACTCGACTAAAAGGAGAGGTTGTGA
Radish	AGTCAATAGGAGCCCTACTTCCCAGGTATTTCTTACTCGACTAAAAGGAGAGGTTGTGA
Cabbage	AGTCAATAGGAGCCCTACTTCCCAGGTATTTCTTACTCGACTAAAAGGAGAGGTTGTGA

C. Cabbage	ACACAAACTCGACTGAAAG-----GAGGGGACA
Rape	ACACAAACTCGACTGAAAG-----GAGAGGGACA
Broccoli	ACACAAACTCGACTGAAAG-----GAGAGGGACA
Radish	ACACAAACTCGACTGAAAGGAGAGGTTGTGAACACAAACTCGACTGAAAGGAGAGGGACA
Cabbage	ACACAAACTCGACTGAAAGGAGAGGTTGTGAACACAAACTCGACTGAAAGGAGAGGGACA

C. Cabbage	AGGGCGGTCTTGCTTGGCGCAAGGCTGCTGTTTGGGGTACGGTACTAAAGGTCCTCG
Rape	AGGGCGGTCTTGCTTGGCGCAAGGCTGCTG-GITGGGGTACGGTACTAAAGGTCCTCG
Broccoli	AGGGCGGTCTTGCTTGGCGCAAGGCTGCTG-GITGGGGTACGGTACTAAAGGTCCTCG
Radish	AGGGCGGTCTTGCTTGGCGCAAGGCTGCTG-GITGGGGTACGGTACTAAAGGTCCTCG
Cabbage	AGGGCGGTCTTGCTTGGCGCAAGGCTGCTG-GITGGGGTACGGTACTAAAGGTCCTCG

C. Cabbage	GACTTCCAGGCGTTTTGATTTTTGGGCAGCTGTTACCCTGGATCTCGCCAATACAGCC
Rape	GACTTCCAGGCGTTTTGATTTTTGGGCAGCTGTTACCCTGGATCTCGCCAATACAGCC
Broccoli	GACTTCCAGGCGTTTTGATTTTTGGGCAGCTGTTACCCTGGATCTCGCCAATACAGCC
Radish	GACTTCCAGGCGTTTTGATTTTTGGGCAGCTGTTACCCTGGATCTCGCCAATACAGCC
Cabbage	GACTTCCAGGCGTTTTGATTTTTGGGCAGCTGTTACCCTGGATCTCGCCAATACAGCC

그림 1-5. 무(DCGMS), 양배추, 유채, 브로콜리, 배추의 미토콘드리아에서 *TrnY/TrnD* intergenic region 염기서열 분석.

C. Cabbage	GCAATCTAACGAATTCGGGAAAGCAAGATGATCGACACTGGAAAAGACGTCTTGGCGAGA
Rape	GCAATCTAACGAATTCGGGAAAGCAAGATGATCGACACTGGAAAAGACGTCTTGGCGAGA
Broccoli	GCAATCTAACGAATTCGGGAAAGCAAGATGATCGACACTGGAAAAGACGTCTTGGCGAGA
Radish	GCAATCTAACGAATTCGGGAAAGCAAGATGATCGACACTGGAAAAGACGTCTTGGCGAGA
Cabbage	GCAATCTAACGAATTCGGGAAAGCAAGATGATCGACACTGGAAAAGACGTCTTGGCGAGA

C. Cabbage	G-----GTGCTTTAGCAACTCGACTGAAAAGCAGAG
Rape	G-----GTGCTTTAGCAACTCGACTGAAAAGCAGAG
Broccoli	G-----GTGCTTTAGCAACTCGACTGAAAAGCAGAG
Radish	G-----GTGCTTTAGCAACTCGACTGAAAAGCAGAG
Cabbage	GGTGCTTTAGCAACTCGACTGCAAGGAGGTTGCTTTAGCAACTCGACTGAAAAGCAGAG
* *****	
C. Cabbage	GGCATAGAGTCACCGACTAAAGCAAGCCAGGAAAGGTAATTGCTTACAGACAGACCATAT
Rape	GGCATAGAGTCACCGACTAAAGCAAGCCAGGAAAGGTAATTGCTTACAGACAGACCATAT
Broccoli	GGCATAGAGTCACCGACTAAAGCAAGCCAGGAAAGGTAATTGCTTACAGACAGACCATAT
Radish	GGCATAGAGTCACCGACTAAAGCAAGCCAGGAAAGGTAATTGCTTACAGACAGACCATAT
Cabbage	GGCATAGAGTCACCGACTAAAGCAAGCCAGGAAAGGTAATTGCTTACAGACAGACCAGAT
***** **	
C. Cabbage	TTTTGAATAGCAGCTTACTCTCAAACACCGTATTCCGCCAAAACCATTTACTACGCAAAC
Rape	TTTTGAATAGCAGCTTACTCTCAAACACCGTATTCCGCCAAAACCATTTACTACGCAAAC
Broccoli	TTTTGAATAGCAGCTTACTCTCAAACACCGTATTCCGCCAAAACCATTTACTACGCAAAC
Radish	TTTTGAATAGCAGCTTACTCTCAAACACCGTATTCCGCCAAAACCATTTACTACGCAAAC
Cabbage	TTTTGAATAGCAGCTTACTCTCAAACACCGTATTCCGCCAAAACCATTTACTACGCAAAC
**** *****	
C. Cabbage	AAGACCGGCAATGGTTTTGAGCTGA
Rape	AAGACCGGCAATGGTTTTGAGCTGA
Broccoli	AAGACCGGCAATGGTTTTGAGCTGA
Radish	AAGACCGGCAATGGTTTTGAGCTGA
Cabbage	AAGACCGGCAATGGTTTTGAGCTGA

그림 1-6. 무(DCGMS), 양배추, 유채, 브로콜리, 배추의 미토콘드리아에서 *TrnM/Atp4* intergenic region 염기서열 분석.

2. 십자화과 엽록체 식별 분자마커 시스템 개발

엽록체 식별 분자마커 또한 미토콘드리아 식별 분자마커 개발과 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과 총 5개의 DCGMS 엽록체를 식별할 수 있는 분자마커를 개발하였다. 먼저 *ycf6* 유전자와 *TrnG* 유전자의 intergenic region에서 in/del을 확인할 수 있었으며, 이를 CP-1이라 명명하였다. 이 region에서는 DCGMS가 유채/양배추에 비해 18bp가 삽입되어 있었고, 브로콜리/배추에 비해서는 57bp가 삽입된 것을 확인할 수 있었다(그림 1-7). *ndhF* 유전자와 *rpl3* 유전자의 intergenic region에서도 DCGMS와 양배추/브로콜리 비교 시에는 DCGMS에서 138bp의 DNA가 삽입되고, 배추와 유채 비교 시에는 각각 140bp/142bp의 DNA가 삽입된 부분을 찾아낼 수 있었다. 이를 CP-2 마커라 명명하였다(그림 1-8). *PetB* 유전자와 *PetD* 유전자의 intergenic region에서도 DCGMS와 양배추 비교 시에는 DCGMS에서 51bp의 DNA가 결실되고, 브로콜리/배추 비교 시에는 DCGMS에서 49bp의 DNA가 결실되었으며, 유채 비교 시에는 48bp의 DNA가 결실된 부분을 찾아낼 수 있고, 이를 CP-3 마커라 명명하였다(그림 1-9). *psbE* 유전자와 *Orf31* 유전자의 intergenic region에서는 DCGMS에서만 112bp가 결실되어 있

는 부분을 찾아 낼 수 있었고, 이를 CP-4 마커라 명명 하였다(그림 1-10). *accD* 유전자와 *ycf10* 유전자의 intergenic region에서는 무에서만 30bp가 삽입되어 있는 부분을 찾아 낼 수 있었고, 이를 CP-5 마커라 명명하였다(그림 1-11).

```

C. Cabage      AATATGAATCAAATATTAATAAATAGCAATTTACTAAATATAACTATGAAATAGTAATAA
Rape          AATATGAATCAAATATTAATAAATAGCAATTTACTAAATATAACTATGAAATAGTAATAA
Broccoli     AATATGAATCAAATATTAATAAATAGCAATTTACTAAATATAACTATGAAATAGTAATAA
Radish       AATATGAATCAAATATTAATAAATAGCAATTTACTAAATATAACTATGAAATAGTAATAA
Cabbage      AATATGAATCAAATATTAATAAATAGCAATTTACTAAATATAACTATGAAATAGTAATAA
*****

C. Cabage      CTAATTTAAAT-AAAAAAAAACGAATCAAAAATTGATATCTGATATCAATATAGAAATAGA
Rape          CTAATTTAAAT-AAAAAAAAACGAATCAAAAATTGATATCTGATATCAATATAG-----A
Broccoli     CTAATTTAAAT-AAAAAAAAACGAATCAAAAATTGATATCTGATATCAATATAG-----A
Radish       CTAATTTAAATAAAAAAAAACGAATCAAAAATTGATATCTGATATCAATATAG-----A
Cabbage      CTAATTTAAATAAAAAAAAACGAATCAAAAATTGATATCTGATATCAATATAG-----A
*****

C. Cabage      ATATAATATTTTATGGAAATAGAGAATAATATATTATTGAATATGGAATTCAATATATAG
Rape          ATATAATATTTTATGGAAATAGAGAATAATATATTATTGAATATGGAATTCTATATATAG
Broccoli     ATATAATATTTTATGGAAATAGAGAATAATATATTATTGAATATGGAATTCTATATATAG
Radish       ATATAATATTTTATGGAAATAGAGAATAATATATTATTGAATATGGAATTCTATATATAG
Cabbage      ATATAATATTTTATGGAAATAGAGAATAATATATTATTGAATATGGAATTCTATATATAG
*****

C. Cabage      ATATAGAATAAATATATTATTAATATATAATATTTTATATATACTAAATATATATATTTT
Rape          ATATAGAATAAATATAT-----
Broccoli     ATATAGAATAAATATAT-----
Radish       ATATAGAATAAATATATTATTAATATATAAT-----AAATATATATATATTTT
Cabbage      ATATAGAATAAATATATTATTAATATATAAT-----AAATATATATATATTTT
*****

C. Cabage      ATATATATTAATAGAATTGTTACTTGAACITTTTTGGTAGTAGAGTTTTATCAAATGACC
Rape          -----TAATAGAATTGTTAATTGAACITTTTTGGTAGTAGAGTTTTATCAAATGACC
Broccoli     -----TAATAGAATTGTTAATTGAACITTTTTGGTAGTAGAGTTTTATCAAATGACC
Radish       ATATATATTAATAGAATTGTTAATTGAACITTTTTGGTAGTAGAGTTTTATCAAATGACC
Cabbage      ATATATATTAATAGAATTGTTAATTGAACITTTTTGGTAGTAGAGTTTTATCAAATGACC
*****

```

그림 1-7. 무(DCGMS), 양배추, 유채, 브로콜리, 배추의 엽록체에서 *ycf6/TrnG* intergenic region 염기서열 분석.


```

C. Cabbage TCTCAGGATTCAGAATTCACGTAACCTGATTCATTGAAAACTCTT-----TAAGAAATTA
Rape TCTCAGGATTCAGAATTCACGTAACCTGATTCATTGAAAACTCTT-----TAAGAAATTA
Broccoli TCTCAGGATTCAGAATTCACGTAACCTGATTCATTGAAAACTCTT-----TAAGAAATTA
Radish TCTCAGGATTCAGAATTCACGTAACCTGATTCATTGAAAACTCTT-----TAAGAAATTA
Cabbage TCTCAGGATTCAGAATTCACGTAACCTGATTCATTGAAAACTCTT-----TAAGAAATTA
*****

C. Cabbage ATAAGAAAAATAATACATAAAAAAAT-AACTCTATTATATAACTTCAGTTAAAAACATAG
Rape ATAAGAAAAATAATACATAAAAAAAT-AACTCTATTATATAACTTCAGTTAAAAACATAG
Broccoli ATAAGAAAAATAATACATAAAAAAAT-AACTCTATTATATAACTTCAGTTAAAAACATAG
Radish ATAAGAAAAATAATACATAAAAAAAT-AACTCTATTATATAACTTCAGTTAAAAACATAG
Cabbage ATAAGAAAAATAATACATAAAAAAAT-AACTCTATTATATAACTTCAGTTAAAAACATAG
*****

C. Cabbage AACTTTTTTTGAATAAACCTGTAAAAATTAATAAAAAAAGTTGTTGATTCITTTTTTTT
Rape AACTTTTTTTGAATAAACCTGTAAAAATTAATAAAAAAAGTTGTTGATTCITTTTTTTT
Broccoli AACTTTTTTTGAATAAACCTGTAAAAATTAATAAAAAAAGTTGTTGATTCITTTTTTTT
Radish AACTTTTTTTGAATAAACCTGTAAAAATTAATAAAAAAAGTTGTTGATTCITTTTTTTT
Cabbage AACTTTTTTT-----
*****

C. Cabbage TAAGTGACCTTAGAACCTAGAATACGCCCTTCTACATTTATTCAAATGAAATAAATT
Rape TAAGTGACCTTAGAACCTAGAATACGCCCTTCTACATTTATTCAAATGAAATAAATT
Broccoli TAAGTGACCTTAGAACCTAGAATACGCCCTTCTACATTTATTCAAATGAAATAAATT
Radish TAAGTGACCTTAGAACCTAGAATACGCCCTTCTACATTTATTCAAATGAAATAAATT
Cabbage TAAGTGACCTTAGAACCTAGAATACGCCCTTCTACATTTATTCAAATGAAATAAATT

C. Cabbage CAATTTTGAATAAAGTAGATTAATATAGTAGAGCAGTTTTCTTCATTTAATCTATGAAAT
Rape CAATTTTGAATAAAGTAGATTAATATAGTAGAGCAGTTTTCTTCATTTAATCTATGAAAT
Broccoli CAATTTTGAATAAAGTAGATTAATATAGTAGAGCAGTTTTCTTCATTTAATCTATGAAAT
Radish CAATTTTGAATAAAGTAGATTAATATAGTAGAGCAGTTTTCTTCATTTAATCTATGAAAT
Cabbage -----GAATAAAGTAGATTAATATAGTAGAGCAGTTTTCTTCATTTAATCTATGAAAT
*****

C. Cabbage TAAACCAAAAAGCAGTATCCTACACGGAGAA
Rape TAAACCAAAAAGCAGTATCCTACACGGAGAA
Broccoli TAAACCAAAAAGCAGTATCCTACACGGAGAA
Radish TAAACCAAAAAGCAGTATCCTACACGGAGAA
Cabbage TAAACCAAAAAGCAGTATCCTACACGGAGAA
*****

```

그림 1-10. 무(DCGMS), 양배추, 유채, 브로콜리, 배추의 엽록체에서 *psbE/Orf31* intergenic region 염기서열 분석.

```

C. Cabbage TCTCCTTCCTTTATATGATCCOCTATAACTATATACATACAAATAAATACATT-----
Rape TCTCCTTCCTTTATATGATCCOCTATAACTATATACATACAAATAAATACATT-----
Broccoli TCTCCTTCCTTTATATGATCCOCTATAACTATATACATACAAATAAATACATT-----
Radish TCTCCTTCCTTTATATGATCCOCTATAACTATATACATACAAATAAATACATT-----
Cabbage TCTCCTTCCTTTATATGATCCOCTATAACTATATACATACAAATAAATACATTGATAAAT
*****

C. Cabbage -----GACTTGAATTTTCATCCAGCGGTCCGATGATGATCCAT
Rape -----GACTTGAATTTTCATCCAGCGGTCCGATGATGATCCAT
Broccoli -----GACTTGAATTTTCATCCAGCGGTCCGATGATGATCCAT
Radish -----GACTTGAATTTTCATCCAGCGGTCCGATGATGATCCAT
Cabbage ATATACATACAAATAAATACATTGACTTGAATTTTCATCCAGCGGTCCGATGATGATCCAT
*****

C. Cabbage TTTTCAAAGAGOGCAAATGAGTTACCCCATATAAATACGTTTACACATGCATAAAAAAC
Rape TTTTCAAAGAGOGCAAATGAGTTACCCCATATAAATACGTTTACACATGCATAAAAAAC
Broccoli TTTTCAAAGAGOGCAAATGAGTTACCCCATATAAATACGTTTACACATGCATAAAAAAC
Radish TTTTCAAAGAGOGCAAATGAGTTACCCCATATAAATACGTTTACACATGCATAAAAAAC
Cabbage TTTTCAAAGAGOGCAAATGAGTTACCCCATATAAATACGTTTACACATGCATAAAAAAC
*****

C. Cabbage TTTTTTAGTTATGTTTGTAGGAATCTATGTGTTATACAATTTCTACCAAATGGGTCTT
Rape TTTTTTAGTTATGTTTGTAGGAATCTATGTGTTATACAATTTCTACCAAATGGGTCTT
Broccoli TTTTTTAGTTATGTTTGTAGGAATCTATGTGTTATACAATTTCTACCAAATGGGTCTT
Radish TTTTTTAGTTATGTTTGTAGGAATCTATGTGTTATACAATTTCTACCAAATGGGTCTT
Cabbage TTTTTTAGTTATGTTTGTAGGAATCTATGTGTTATACAATTTCTACCAAATGGGTCTT
*****

C. Cabbage ATCAAATCGAA
Rape ATCAAATCGAA
Broccoli ATCAAATCGAA
Radish ATCAAATCGAA
Cabbage ATCAAATCGAA
*****

```

그림 1-11. 무(DCGMS), 양배추, 유채, 브로콜리, 배추의 엽록체에서 *accD/ycf10* intergenic region 염기서열 분석.

제 2 절. 무/양배추/유채/브로콜리/배추 자원 확보 및 원형질체 분리체계 확립

비대칭 원형질체 융합을 통한 융성불임 육종 자원 개발 연구를 위해 1차 년도에는 우선 원형질체 융합 식물 재료로 사용될 무 융성불임 라인과 양배추, 브로콜리, 유채, 배추 등 십자화과 작물의 라인을 확보하고 기내 배양 체계를 확립해서 식물체를 대량 증식 시킨 후 각각의 작물별로 최적의 원형질체 분리조건을 확립하였다.

1. 무융성불임(DCGMS) 라인 확보 및 원형질체 분리 체계 확립

가. 식물재료의 발아율 검정

본 연구에 사용된 식물재료(무, 유채, 배추, 브로콜리 및 양배추)의 기내 배양체계 확립 및 원형질체 분리를 위한 기내 배양체 재료 확보를 위하여 각 식물 재료의 발아율 및 오염율을 조사한 결과 무(ADBR-3), 배추(ADBCC-3)의 발아율이 각각 23, 25%로 매우 낮았다. 나머지 식물재료의 각 계통은 발아율이 80%이상, 오염률은 3%이하로 기내 발아를 통한 무균 식물체의 확보가 가능하였다(표 2-1).

표 2-1. 식물재료의 발아율 및 오염률 조사

작물명	계통명	발아율 (%)	오염율 (%)
무	ADBR-3	23	80
유채	ADBN-5	100	0
브로콜리	ADBB-1	83	0
	ADBB-2	93	0
양배추	ADBC-1	77	0
배추	ADBCC-1	43	0
	ADBCC-2	70	0
	ADBCC-3	25	0
	ADBCC-7	90	10
	ADBCC-8	97	0
	ADBCC-9	93	3

나. 무 융성불임(DCGMS) 라인 확보 및 기내 배양체계 확립

본 연구에 사용된 무 융성불임(DCGMS) 라인은 제 1세부 연구팀에서 제공된 종자를 사용하였다. 무의 기내배양을 위하여 10% 락스용액으로 20분간 표면살균 후 소독된 종자를 MS 기본

배지에 발아시켜 무균식물체를 배양 유지하였다. 아울러 무균 발아된 자엽 및 배축으로부터 2,4-D가 1 mg/L 첨가된 MS 배지를 사용하여 25℃ 명배양을 통하여 callus를 유도 배양체계를 유지하였다.

다. 무 자엽 및 배축으로부터 원형질체 유리 조건 확립

약 1주일 무균 발아된 유식물체의 자엽 및 배축 약 1 g을 수거하여 CPW 13M 용액에 3시간 전처리한 다음 세포벽분해효소용액으로 16시간동안 25℃ 암배양을 하였다. 실험에 사용된 세포벽분해효소용액의 조성은 표 2-2와 같다. 유리된 원형질체를 CPW 9M 용액으로 세척 후 회수된 원형질체는 약 5×10^5 정도 이었으며 2종류의 세포벽분해효소용액의 원형질체 분리 효율을 조사한 결과 배추의 경우 처럼 VCP 효소 용액이 원형질체 분리 효율이 높았다 (그림 2-1).

표 2-2. 원형질체 유리 세포벽분해효소용액 조성

C.M	V.C.P
CPW 9M	CPW 9M
3 mM MES	3 mM MES
2% Cellulase R10	1% Viscozyme
0.5% Macerozyme	0.5% Celluclast
pH 5.8	0.5% PectinEX
	pH 5.8

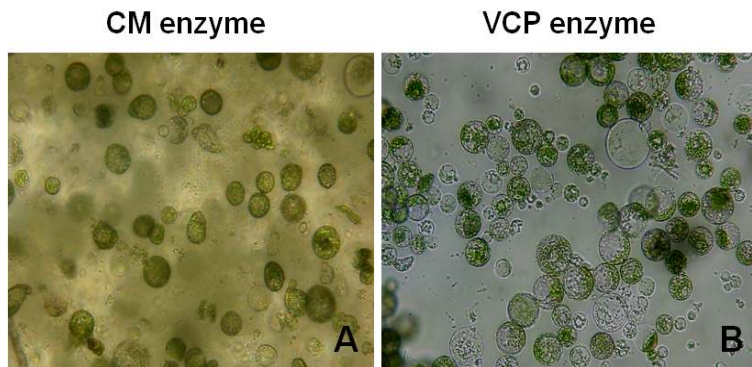


그림 2-1. 무 자엽으로부터 원형질체 분리체계 확립. A: 2% cellulase R10 + 0.5% macerozyme (Yakult) 용액; B: Viscozyme, celluclast 및 pectinEX (Novozyme) 혼합 용액.

2. 유채/배추/브로콜리/양배추의 기내배양 및 원형질체 분리 조건 확립

가. 유채 원형질체 분리 및 배양체계 확립

무균 발아 된 유채의 소식물체의 자엽으로부터 CPW 13M용액 (CPW salts +13% mannitol) 전처리 시간 및 효소 용액 배양시간이 원형질체 분리 효율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 전처리를 하지 않은 경우 원형질체 yields는 약 5×10^5 개 이지만 전처리 시간이 증가할수록 원형질체 yields는 증가하여 3시간 전처리 한 경우 약 1.5×10^6 개로 무처리구에 비하여 약 3배 가량 증가됨을 알 수 있었다(그림 2-2). 또한 효소 용액의 배양시간이 원형질체 yields에 미치는 영향을 조사한 결과 배양시간이 4시간에서 16시간으로 증가할수록 원형질체 yields는 약 2-6배 정도 증가함을 알 수 있었다(그림 2-2). 본 유채의 결과를 통하여 전처리 및 효소 배양시간은 타 작물의 원형질체 분리 체계 확립에 적용한 결과 타 작물에서도 거의 유사한 패턴을 보임을 알 수 있었다.

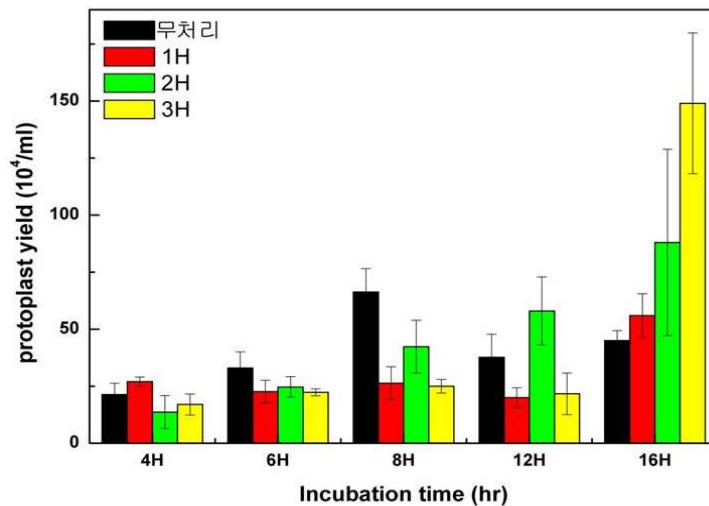


그림 2-2. 유채 자엽으로부터 전처리 시간 및 효소액 배양시간이 원형질체 분리효율에 미치는 영향.

분리된 유채의 원형질체로부터 원형질체 배양에 미치는 성장조절제, osmoticum, 탄소원 및 배양 밀도의 영향을 조사하였다. 성장조절제의 경우 2,4-D와 BA를 여러 농도로 혼용 처리하여 원형질체의 세포분열 효율을 조사한 결과 2,4-D는 1-3 mg/L 범위 그리고 BA는 0.3-0.5 mg/L 범위내의 혼용처리가 세포분열 효율이 좋음을 알 수 있었다. 2,4-D와 BA의 단독처리구의 경우 전혀 세포분열이 이루어지지 않았으며 BA의 상대적 ratio가 증가하면 오히려 세포분열이 감소하였다(표 2-3).

표 2-3. 유체의 원형질체 배양에 미치는 성장조절제 영향

2.4-D	0	0.1	0.3	1	3	10
	-	-	-	-	-	-
BA	0	0.1	0.3	1	3	10
	-	-	-	-	-	-
2.4-D/BA	1/0.1	1/0.3	1/0.5	1/1	1/3	0
	-	+	++	+	+	-
2.4-D/BA	3/0.1	3/0.3	3/0.5	3/1	3/3	3/5
	+	++	+++	+	+	+
24well plate에 protoplast suspension (5×10^4 /ml) 200ul첨가 후 여과 살균된 2.4-D,BA 첨가						

Osmoticum 및 원형질체 배양밀도가 유체의 원형질체 배양에 미치는 영향을 조사한 결과 배양밀도가 1×10^4 개에서는 9% mannitol 과 6% myo-inositol 모두 세포분열이 이루어지지 않았으며 배양밀도가 5×10^4 개에서는 9% mannitol 과 6%myo-inositol 처리구에서 약 15% 분열 효율을 보였다. 아울러 1×10^5 및 2×10^5 처리구에서는 분열 효율이 20-25% 정도로 mannitol 및 myo-inositol 처리구에서 모두 높은 효율의 세포분열을 관찰 할 수 있었다(그림 2-3).

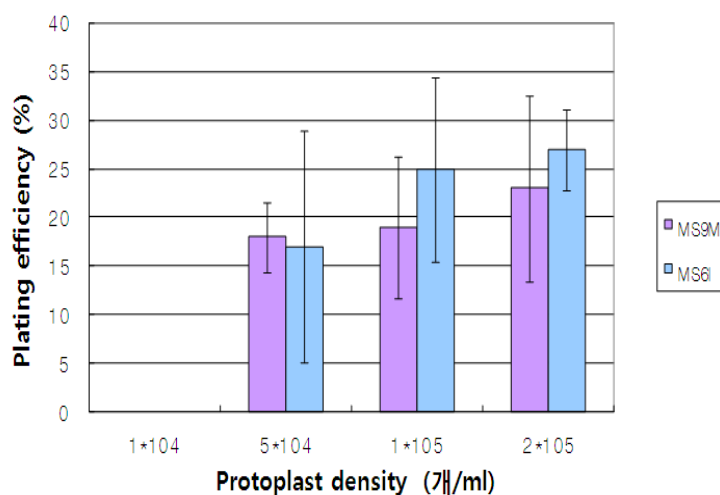


그림 2-3. 유체 자엽유래 원형질체의 배양에 미치는 osmoticum 및 배양밀도의 영향.

탄소원으로 sucrose 및 glucose가 유체의 원형질체 배양에 미치는 영향을 조사한 결과 배양 밀도가 1×10^5 개에서 3% sucrose 및 3% glucose의 세포분열 효율은 각각 18%, 20%이었다. 그러나 배양밀도가 2×10^5 개에서는 세포분열 효율이 각각 30% 및 25%로 증가됨을 알 수 있었다. 배양밀도가 증가할수록 세포분열효율이 증가된 것으로 관찰되었으나 이는 배양밀도가 높아

지게 되면 현미경 관찰시 원형질체간의 중첩이 증가되어 수치상으로 과다 계산된 것으로 사료된다(그림 2-4).

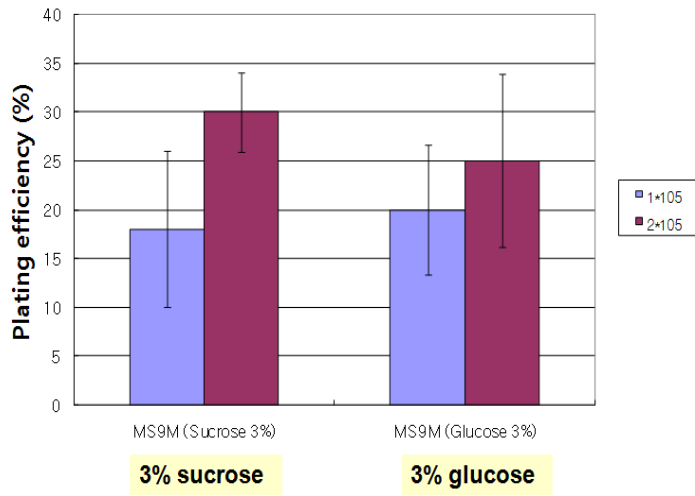


그림 2-4. 유채 자엽유래 원형질체의 배양에 미치는 탄소원 및 배양밀도의 영향.

유채의 원형질체를 이용하여 십자화과 작물의 원형질체 배양에 요구되는 제요인의 영향을 조사하여 배양체계를 확립하였다(그림 2-5). 본 원형질체 분리 및 배양체계는 본 연구의 융합 재료인 십자화과 작물의 고효율의 원형질체 유리 및 배양 시스템 확립을 위해 중요한 요인이 라 사료된다.

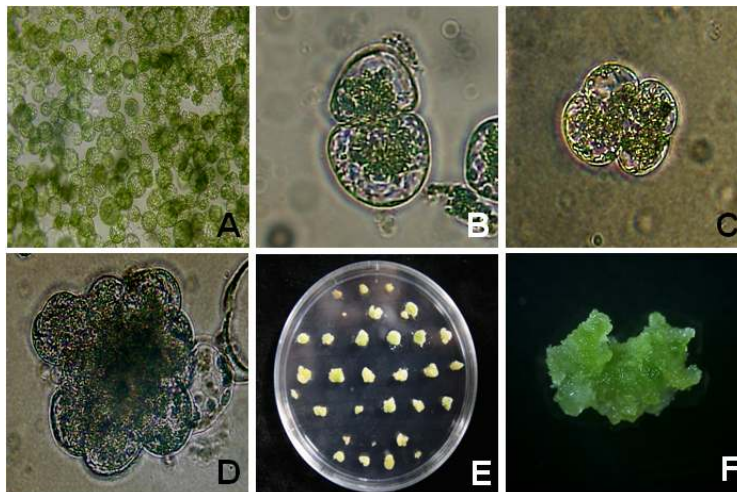


그림 2-5. 유채 자엽유래 원형질체 배양체계 확립. A: Freshly isolated protoplast; B: First cell division; C: Second cell division; D: Cell colony formation; E: Microcalli formation; F: Shoot induction from protoplast-derived green callus.

상기의 원형질체 분리 및 배양체계를 이용하여 본 연구과제의 각 작물별로 분열 효율을 조사한 결과 배추는 배양밀도가 5×10^4 개에서 분열효율이 30%로 가장 높았고 양배추, 유채 및 브로콜리의 경우 배양밀도가 증가할수록 분열효율이 증가하여 23% 및 15% 임을 알 수 있었다(그림 2-6). 융합체의 배양 조건을 확립하기 전에 먼저 각 식물체의 재생체계를 시험적으로 관찰하기 위해 약 2주 정도 배양한 원형질체가 활발하게 분열하여 콜로니를 형성하였을 때 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 작물 별로 약간의 차이가 있으나 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA가 첨가된 MS 배지로 옮겨 신초를 유도하였다.

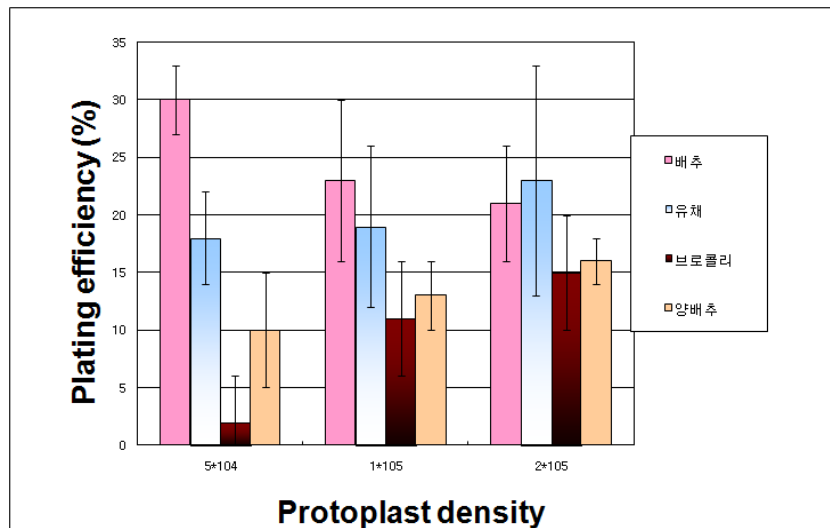


그림 2-6. 각 작물별 원형질체 배양밀도에 따른 원형질체 세포분열 효율 비교.

나. 배추 원형질체 분리 및 배양체계 확립

상기의 원형질체 분리 및 배양체계를 이용하여 배추의 원형질체 분리 및 배양체계를 확립하였다(그림 2-7). 배양밀도가 5×10^4 개에서 분열효율이 30%로 가장 높았으며 약 2주 정도 배양한 원형질체가 활발하게 분열하여 콜로니를 형성하였을 때 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮긴 다음 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA가 첨가된 MS 배지로 옮겨 신초를 유도하였다.

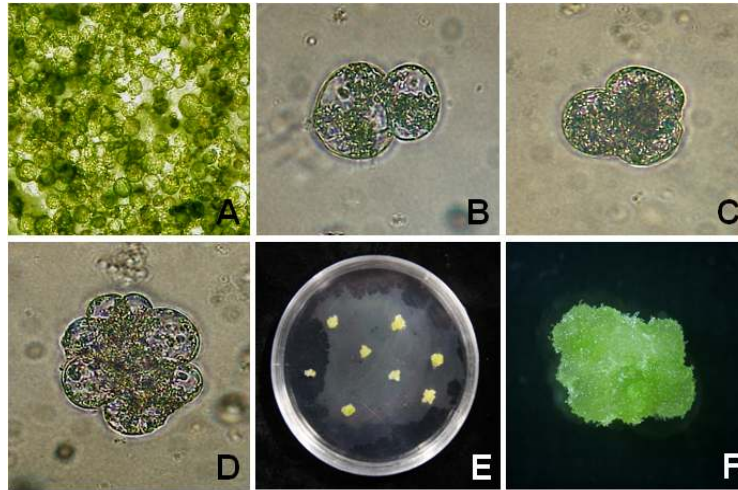


그림 2-7. 배추 자엽유래 원형질체 배양체계 확립. A: Freshly isolated protoplast; B: First cell division; C: Second cell division; D: Cell colony formation; E: Microcalli formation; F: Shoot induction from protoplast-derived green callus.

다. 브로콜리 원형질체 분리 및 배양체계 확립

상기의 원형질체 분리 및 배양체계를 이용하여 브로콜리의 원형질체 분리 및 배양체계를 확립하였다(그림 2-8). 배양밀도가 2×10^5 개에서 분열효율이 15%로 가장 높았으며 약 2주 정도 배양한 원형질체가 활발하게 분열하여 콜로니를 형성하였을 때 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 신초를 유기하기 위해 BA가 첨가된 MS 배지로 callus를 옮겨 배양하였다.

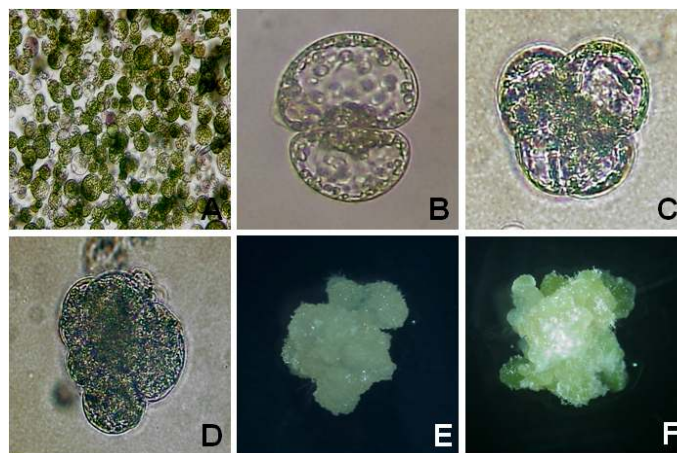


그림 2-8. 브로콜리 자엽유래 원형질체 배양체계 확립. A: Freshly isolated protoplast; B: First cell division; C: Second cell division; D: Cell colony formation; E: Microcalli formation; F: Shoot induction from protoplast-derived green callus.

라. 양배추 원형질체 분리 및 배양체계 확립

상기의 원형질체 분리 및 배양체계를 이용하여 양배추의 원형질체 분리 및 배양체계를 확립하였다(그림 2-9). 배양밀도가 5×10^4 개에서 분열효율이 18%로 가장 높았으며 약 2주 정도 배양한 원형질체가 활발하게 분열하여 콜로니를 형성하였을 때 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮긴 다음 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA가 첨가된 MS 배지로 옮겨 싹을 유도하였다.

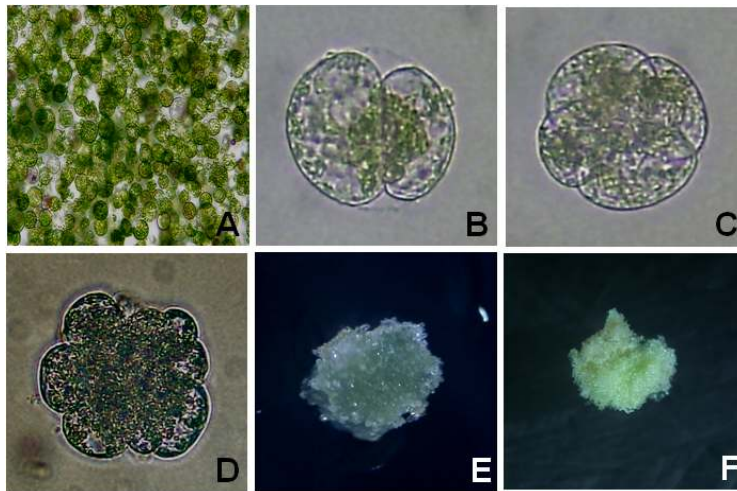


그림 2-9. 양배추 자엽유래 원형질체 배양체계 확립. A: Freshly isolated protoplast; B: First cell division; C: Second cell division; D: Cell colony formation; E: Microcalli formation; F: Shoot induction from protoplast-derived green callus.

마. 원형질체 분리 효율 증대

기존 Cellulase R10 및 Macerozyme R10 (Yakult Honsha Co. Ltd.)의 대체를 위한 Viscozyme (Novozyme Co. Ltd.)의 십자화과 작물 적용 타당성 검사를 조사하였다. 최적의 Enzyme 조성은 Cellulase를 2%, Macerozyme을 0.5%로 할 경우와 Novozyme의 Viscozyme: Celluclast : Pectinex를 1 : 0.5 : 0.5의 비율로 하여 압조건에서 약 10 rpm 속도로 16시간 정도 진탕시켰을 때 배추 자엽에서 원형질체의 유리정도가 최고가 됨을 확인하였다 (표 2-2, 그림 2-10). 특히 다른 작물에 비교 시 protoplast yields가 높은 배추의 경우 CM의 경우 1g 당 약 2×10^6 개 그러나 VCP의 경우 $5-6 \times 10^6$ 개 정도의 protoplast가 분리되어 분리 효율이 2.5-3 배 정도 증가됨을 알 수 있었다(그림 2-10).

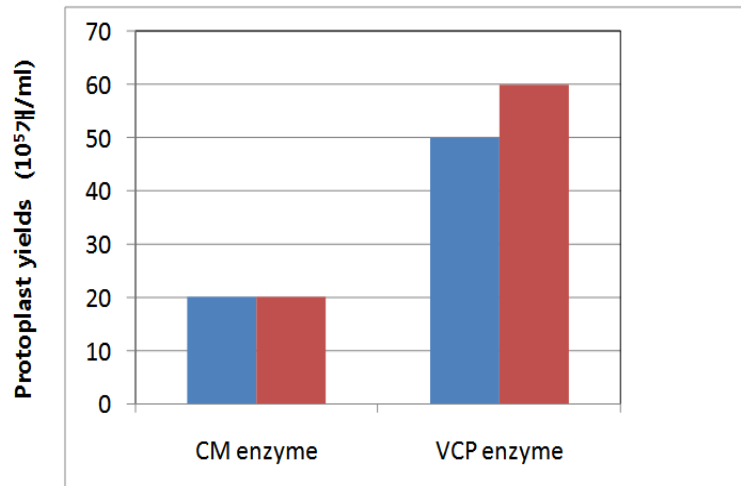


그림 2-10. 세포벽 분해 효소에 따른 배추 원형질체 분리 효율 비교.

또한 VCP의 경우 자엽의 전처리 없이도 분리가 가능하며 효소처리 후 sucrose gradient CPW 21S 용액으로 층분리 과정을 거치지 않아도 효율적인 분리가 가능하였다. CM과 VCP로 분리한 배추 원형질체의 분열 효율을 조사한 결과 배양밀도별로 분열 효율이 큰 차이를 보이지 않았다(그림 2-11). 따라서 향후 다량의 원형질체가 요구되는 융합과정에서 원형질체의 분리 효율 증대를 위하여 VCP의 적용은 매우 효율적인 체계라 사료된다.

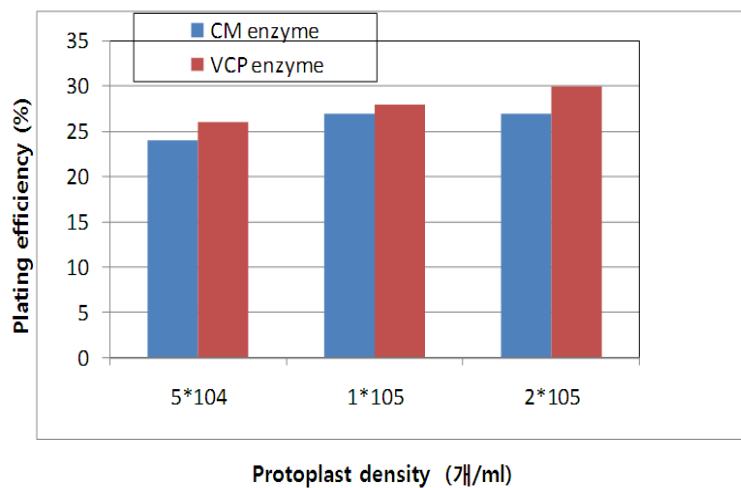


그림 2-11. 세포벽 분해 효소에 따른 배추 원형질체의 세포분열 효율 비교.

제 3 절. 양배추/유채/브로콜리/배추 원형질체로부터 식물체 재생 체계 확립

1차 년도에 확립된 십자화과 작물의 원형질체 분리 및 배양 체계를 통해 각 작물별로 고효율 식물체 재생 체계를 확립하였다.

1. 양배추 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립

확립된 양배추의 원형질체 분리 및 배양 체계를 통해 양배추 callus를 대량 확보하고 이로부터 고효율 식물체 재생 체계를 확립하였다. 먼저 기내에서 발아시킨 양배추 자엽을 MS 기본 배지에 BA(0, 1, 2, 5, 10 mg/L)와 NAA(0.5 mg/L)가 각각 농도별로 처리된 5 종류의 배양배지에 자엽 절편을 plate 당 10개씩 치상하고 각 처리구당 3 반복하여 배양한 결과 NAA 단독 처리된 배지를 제외한 모든 배양배지에서 2-3주 안에 shoot가 나오는 것을 관찰하였다. 특히 2 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA를 혼용한 배양배지 조건에서 80% 이상 shoot가 관찰되어 양배추의 자엽 절편으로부터 식물체 재분화에 효과적임을 알 수 있었다(그림 3-1). 또한 배지 고형제로 0.8% (w/v) agar 보다는 0.4% (w/v) Gelrite를 사용했을 때 자엽 절편으로부터 shoot 형성률이 약 2-3배 증가함을 알 수 있었다(그림 3-1). 이상의 결과를 통해 양배추의 식물체 재생 조건은 2 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA를 혼용 처리한 MS 배지를 사용하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

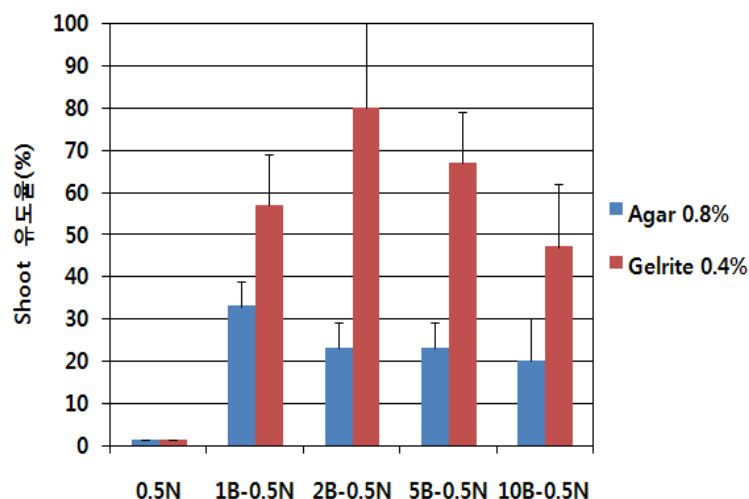


그림 3-1. 양배추 자엽 explant로부터 shoot 형성율.

상기의 결과를 토대로 양배추 자엽 유래 원형질체로부터 얻어진 callus를 BA 2 mg/L와 NAA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨 배양한 결과 약 1달 정도 후에 callus로부터 shoot가 발생함을 관찰하였고 신장이 이루어진 shoot를 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS 배양 배지로 옮겨 배양한 결과 뿌리가 발생하는 것을 관찰하였다(그림 3-2). 뿌리가 발생한 식물체를 agar를 제거 후 토양으로 옮겨 순화시켰더니 정상적인 식물체로 재생되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 3-3).

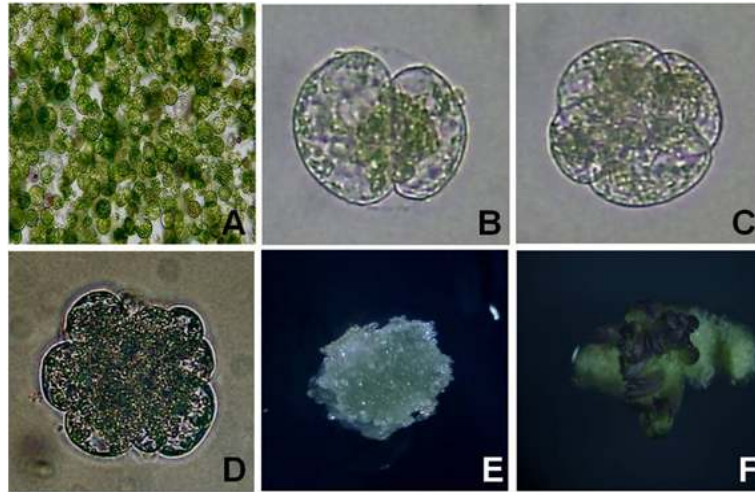


그림 3-2. 양배추 자엽유래 원형질체 재생체계 확립. A: Freshly isolated protoplast; B: First cell division; C: Second cell division; D: Cell colony formation; E: Microcallus formation; F: Shoot induction from protoplast-derived green callus.

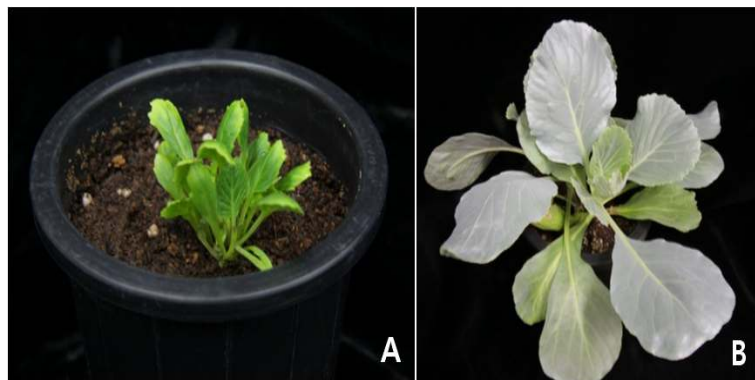


그림 3-3. 양배추 원형질체 유래 callus로부터 식물체 재생체계 확립. A: 토양 이식 초기; B: 정상 식물체 재생.

2. 유채 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립

양배추와 마찬가지로 유채의 callus를 대량 확보하여 고효율 식물체 재생 체계를 확립하였다. 먼저 기내에서 발아시킨 유채 자엽을 MS 기본배지에 BA(0, 1, 2, 5, 10 mg/L)와 NAA(0.5 mg/L)가 각각 농도별로 처리된 5 종류의 배양배지에 자엽 절편을 plate 당 10개씩 치상하고 각 처리구 당 3 반복하여 배양한 결과 NAA 단독 처리된 배지를 제외한 모든 배양배지에서 2-3주 안에 shoot가 나오는 것을 관찰하였다. 특히 2 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA를 혼용한 배양배지 조건에서 40% 이상 shoot가 관찰되어 유채의 자엽 절편으로부터 식물체 재분화에 효과적임을 알 수 있었다 (그림 3-4). 또한 배지 고형제로 양배추와 달리 0.4% (w/v) Gelrite 보다는 0.8% (w/v) agar를 사용했을 때 자엽 절편으로부터 shoot 형성률이 약 2-3배 증가함을 알 수 있었다(그림 3-4). 이상의 결과를 통해 양배추의 식물체 재생 조건은 2 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA를 혼용 처리한 MS 배지를 사용하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

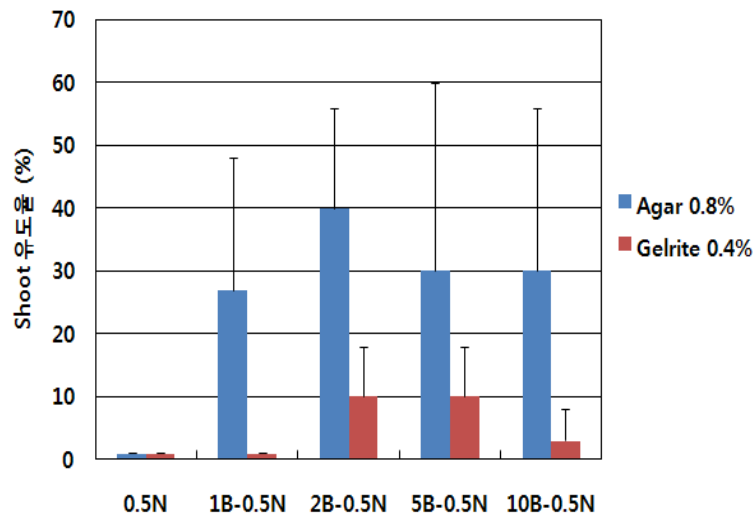


그림 3-4. 유채 자엽 explant로부터 shoot 형성율.

상기의 결과를 토대로 유채 자엽 유래 원형질체로부터 얻어진 callus를 BA 2 mg/L와 NAA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨 shoot를 유도하였으나 자엽 explant의 결과와는 달리 callus 증식만 이루어지면서 shoot 발달을 관찰 할 수 없었다(그림 3-5). callus가 증식이 이루어지면 다양한 재분화 조건을 조사하여 식물체 재생체계를 확립할 수 있기 때문에 여러 가지 성장조절제의 조합 처리가 이루어진 배양배지에 원형질체 유래 callus를 옮겨 shoot를 유도하였다. 또한 유채의 경우 genotype에 따라 재분화율에 차이가 많으므로 기존에 사용하던 재료 이외에 서양유채 종자를 제 1세부 연구팀에서 추가로 제공받아 확립된 원형질체 배양체계를 이용하여 callus를 확보하고자 하였다.

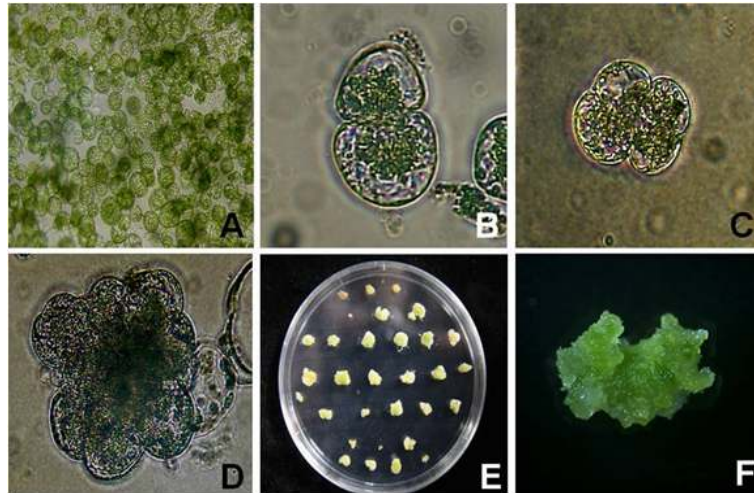


그림 3-5. 유채 자엽유래 원형질체 재생체계 확립 A: Freshly isolated protoplast; B: First cell division; C: Second cell division; D: Cell colony formation; E: Microcalli formation; F: Green callus formation.

3. 브로콜리 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립

브로콜리의 자엽으로부터 고효율 식물체 재생 체계를 확립하였다. 먼저 기내에서 발아시킨 브로콜리의 자엽을 MS 기본배지에 성장조절제로 BA, NAA, Zeatin 및 IAA를 농도별로 처리된 배양배지에 자엽 절편을 plate 당 10개씩 치상하고 각 처리구당 3 반복하여 배양한 결과 zeatin, IAA, GA₃ 혼용 배지에서 약 70% 정도 shoot가 나오는 것을 관찰하였다(그림 3-6). 나머지 처리구에서는 거의 shoot가 유도되지 않거나 형성 빈도가 크게 감소하였다. 또한 배지 고형제로 0.8% (w/v) agar 보다는 0.4% (w/v) Gelrite를 사용했을 때 자엽 절편으로부터 shoot 형성률이 약 2-3배 증가함을 알 수 있었다. 또한 암배양보다는 명배양 조건에서 재분화율이 증가함을 알 수 있었다(그림 3-6). 이상의 결과를 통해 브로콜리의 식물체 재생 조건은 zeatin 2 mg/L, IAA 0.2 mg/L, GA₃ 0.03 mg/L를 혼용 처리한 MS 배지를 사용하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

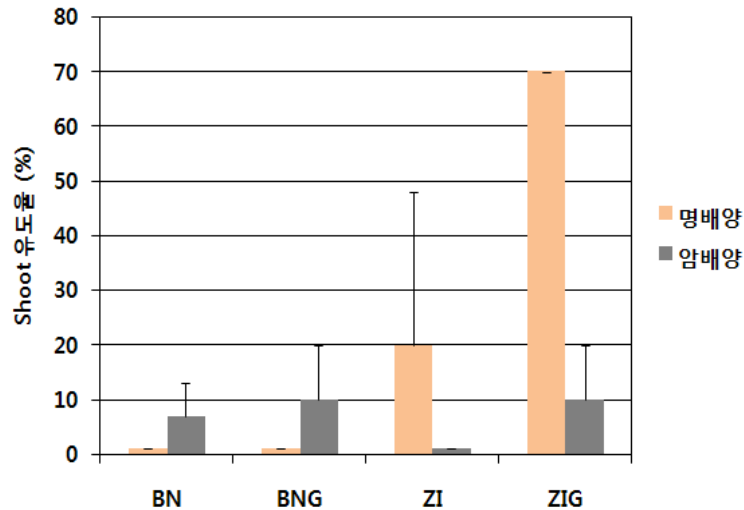


그림 3-6. 브로콜리 자엽 explant로부터 shoot 형성율.

상기의 결과를 토대로 브로콜리 원형질체로부터 얻어진 callus를 zeatin 2 mg/L, IAA 0.2 mg/L, GA₃ 0.03 mg/L를 첨가한 MS 배양배지에 옮겨 배양한 결과 약 1달 정도 후에 shoot가 유기 되었고(그림 3-7), 신장이 이루어진 shoot를 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS 배지에 옮겨 배양한 결과 뿌리가 발생 되었으며 뿌리가 신장된 후 토양에 옮겨 순화시켰더니 정상적으로 식물체 발달이 이루어짐을 관찰할 수 있었다(그림 3-8).

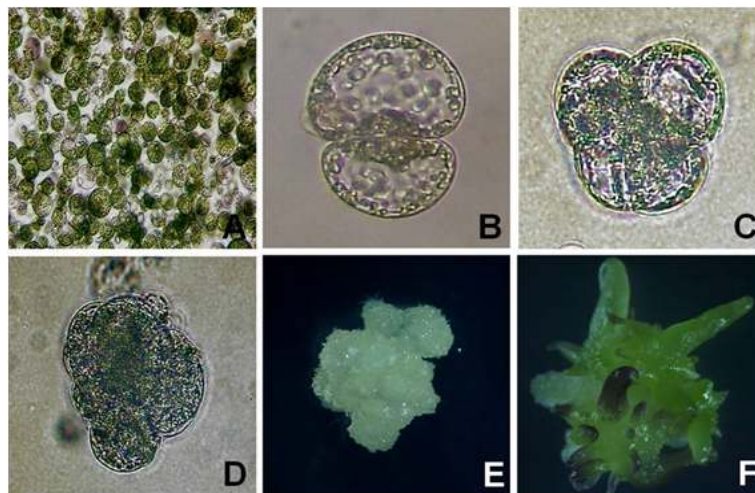


그림 3-7. 브로콜리 자엽유래 원형질체 재생체계 확립. A: Freshly isolated protoplast; B: First cell division; C: Second cell division; D: Cell colony formation; E: Microcallus formation; F: Shoot induction from protoplast-derived green callus.

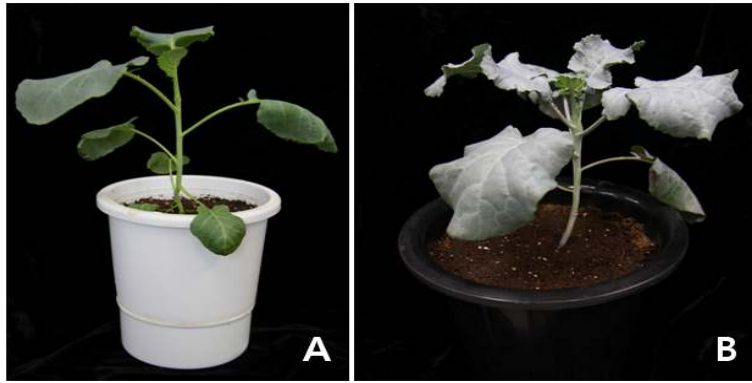


그림 3-8. 브로콜리 원형질체 유래 callus로부터 식물체 재생체계 확립. A: 토양 이식 초기; B: 정상 식물체 재생.

4. 배추 원형질체로부터 식물체 재생체계 확립

양배추와 마찬가지로 배추의 자엽 절편으로부터 고효율 식물체 재생 체계를 확립하였다. 먼저 기내에서 발아시킨 배추 자엽을 MS 기본배지에 BA(0, 1, 2, 5, 10 mg/L)와 NAA(0.5 mg/L)가 각각 농도별로 처리된 5 종류의 배양배지에 자엽 절편을 plate 당 10개씩 치상하고 각 처리구당 3 반복하여 배양한 결과 NAA 단독 처리된 배지를 제외한 모든 배양배지에서 2-3주 안에 shoot가 나오는 것을 관찰하였다. 특히 1 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA를 혼용한 배양배지 조건에서 70% 이상 shoot가 관찰되어 배추의 자엽 절편으로부터 식물체 재분화에 효과적임을 알 수 있었다(그림 3-9). 또한 배지 고형제의 영향을 조사한 결과 0.4% (w/v) Gelrite 보다는 0.8% (w/v) agar를 사용했을 때 자엽 절편으로부터 shoot 형성률이 크게 증가함을 알 수 있었다(그림 3-9). 아울러 암배양 보다는 명배양 조건에서 shoot 형성률이 높았다. 이상의 결과를 통해 배추의 식물체 재생 조건은 1 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA를 혼용 처리한 MS 배지를 사용하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

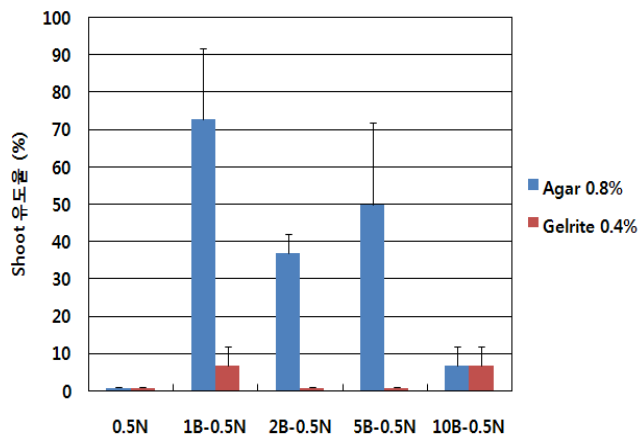


그림 3-9. 배추 자엽 explant로부터 shoot 형성율.

이상의 결과를 토대로 배추 원형질체로부터 얻어진 callus(그림 3-10)를 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L를 첨가한 MS agar 배지에 옮겨 싹을 유도했으나 callus만 증식하였고 자엽 explant의 결과와는 달리 싹 발달을 관찰 할 수 없었다. 따라서 여러 가지 생장조절제가 조합 처리된 배지에 callus를 옮겨 shoot 발달을 유도 시험하였다. callus 증식이 이루어지면 shoot 재분화 조건을 다양하게 시험할 수 있고 배추의 경우 genotype에 따라 재분화율에 차이가 많으므로 기존에 사용하던 장미배추 외에 금진주, 황성 배추 종자를 제 1세부 연구팀에서 추가로 제공받아 원형질체를 분리하고 배양하여 microcalli를 얻었으며 callus를 증식시키고자 하였다.

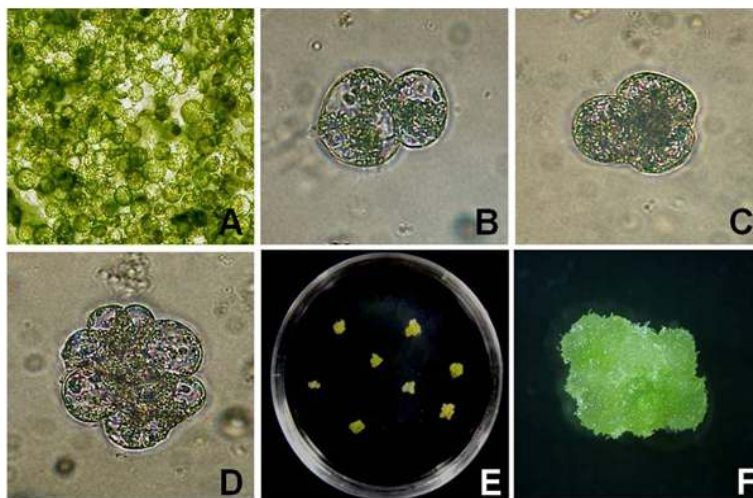


그림 3-10. 배추 자엽유래 원형질체 재생체계 확립. A: Freshly isolated protoplast; B: First cell division; C: Second cell division; D: Cell colony formation; E: Microcalli formation; F: Green callus formation.

제 4 절. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체 융합 체계 확립

Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 융합체계 확립을 위하여 무의 핵불활성화 및 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추)의 세포질 불활성화 체계를 확립하였으며 전기융합 조건을 규명하여 각 작물별로 효율적인 비대칭원형질체 융합체계를 확립하였다.

1. 무 원형질체의 핵 불활성화 체계 확립

일반적으로 원형질체의 핵 불활성화 또는 제거를 위해 사용되는 방법으로는 방사선 조사와 초고속원심분리 방법이 있다. 이 중 초고속원심분리 방법은 cytoplasm의 분리 효율이 낮거나 불안정하고 융합 효율이 떨어지는 단점이 있어 잘 사용하지 않음이 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 방사선을 이용하여 무 원형질체의 핵을 불활성화 시키는 방법을 확립하였다. 방사선 조사는 한국원자력 연구원 정읍 방사선과학연구소에서 Co60 감마선을 이용하였고 파종 후 약 2~3주된 무 식물체에 일정 세기로 약 3시간 정도 조사하여 핵 불활성화를 시도하였다.

감마선의 세기를 각각 0, 300, 500, 700, 1000, 1500 Gy 로 조정하여 무 식물체에 조사한 다음 원형질체를 분리하여 배양하였다. 감마선을 처리하지 않은 식물체에서 분리된 원형질체는 배양 3~4일 경과 후 1차 세포분열을 한 다음 세포 증식이 이루어졌으나 300 Gy 이상 처리한 식물체에서 분리된 원형질체의 경우 분리 초기에는 형태적으로 정상 원형질체와 식별이 불가능 하였으며 배양 초기에는 세포분열과 유사한 세포가 일부 발견되었으나 더 이상 세포분열이 진행되지 않고 퇴화됨을 관찰하였다(그림 4-1).

따라서 300 Gy 이상 방사선 조사가 이루어지면 무 식물체의 핵이 불활성화됨을 알 수 있었다. 또한 방사선의 세기가 너무 높을 경우 식물체에 손상을 주어 융합 효율이 떨어질 수 있으므로 융합에 사용되는 무 식물체의 경우 500 Gy 이상을 조사하지 않는 것이 적당할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 융합에 사용되는 적절한 방사선 세기를 300~500 Gy 정도 조정하여 무의 핵 불활성화에 사용하였다.

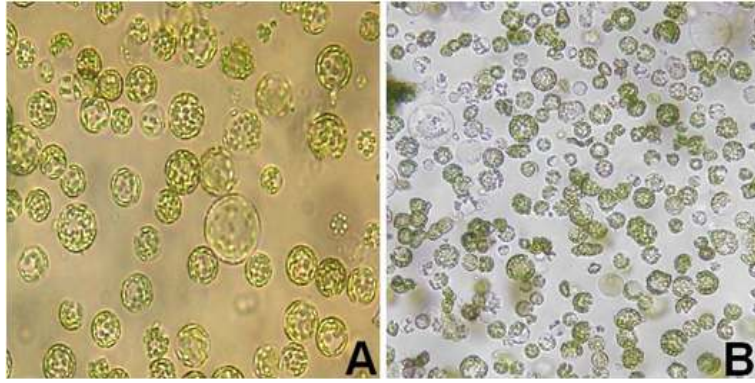


그림 4-1. 감마선으로 처리한 무 원형질체 분리 및 배양 후 세포 관찰. A: Freshly isolated protoplast from γ -ray irradiated radish; B: γ -ray irradiated radish protoplast after 3 wks of culture.

2. 양배추/유채/브로콜리/배추 원형질체의 세포질 불활성화 체계 확립

핵물질의 공여자인 양배추/유채/브로콜리/배추의 세포질을 불활성화하는 방법을 확립하였다. 이들 식물체의 원형질체에 Iodoacetate (IOA)를 일정 농도와 시간으로 처리하면 효과적으로 세포질을 불활성화 시킬 수 있음을 확인하였다(그림 4-2). 그 조건은 식물체 마다 약간씩 상이하였다.

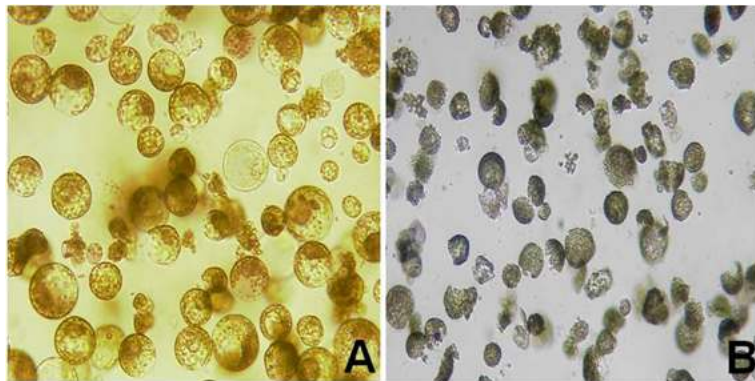


그림 4-2. IOA로 처리한 양배추 원형질체 및 배양 후 세포 모습. A: Freshly isolated cabbage protoplast treated with 3 mM IOA; B: 3 mM IOA treated cabbage protoplast after 2 wks of culture.

가. 양배추 원형질체의 세포질 불활성화 조건 확립

양배추 자엽으로부터 원형질체를 분리하여 CPW 9M (CPW salts +9% mannitol) 용액으로 2회 세척 후 1, 3, 5 mM IOA 용액을 각각 0, 3, 5, 10분간 처리하고 CPW 9M 용액으로 2회 추가 세척하였다. 분리된 원형질체를 hemocytometer를 이용하여 계수하여 배양밀도를 2×10^5 개로 조정하고 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L가 첨가된 NH_4NO_3 제거 MS 배지에 배양하였다. 그 결과 1 mM IOA 처리구에서는 최장 10분간 처리가 이루어졌음에도 불구하고

하고 정상적인 세포분열이 이루어짐을 관찰하였다. 3 mM IOA 처리구에서도 3분 처리구까지는 원형질체가 정상적으로 분열하여 1~2주 사이에 콜로니 단계까지 진행되었지만 5분 이상 처리구에서는 정상적인 세포분열이 이루어지지 않았다 (그림 4-2). 5-10 mM IOA 처리구에서는 단기간의 처리에도 불구하고 원형질체가 세포분열을 하지 못하고 찌그러지거나 죽은 세포들이 대부분 관찰되었다.

결과적으로 양배추의 세포질을 효과적으로 불활성화 시키기 위해서는 3 mM IOA로 5분 이상 처리해야 함을 확인하였다. 이상의 결과를 토대로 세포의 손상을 최소화하고 원형질체 융합에 적합한 양배추 원형질체의 세포질 불활성화를 위한 최적 IOA의 농도는 3 mM, 처리시간은 5~10분 이내가 최적 조건임을 알 수 있었다(표 4-1).

표 4-1. 양배추 원형질체 세포질 불활성화 조건

구분	양배추			
	IOA 농도(mM)			
처리시간(분)	1	3	5	10
0	+	+	-	-
3	+	+	-	-
5	+	-	-	-
10	+	-	-	-

나. 유채 원형질체의 세포질 불활성화 조건 확립

상기의 양배추 원형질체 세포질 불활성화 조건을 바탕으로 유채 원형질체의 세포질 불활성화 조건을 조사하였다. 유채의 경우 양배추와 달리 0, 1 mM, 3 mM, 5 mM 3분, 5분 처리구에서는 원형질체가 정상적으로 분열하여 1~2주 사이에 콜로니 단계까지 진행되었으나 5 mM 10분 처리구 및 IOA, 10 mM 처리구에서는 세포분열을 하지 못하고 찌그러지거나 죽은 세포들이 대부분 관찰되었다. 이상의 결과를 토대로 유채 원형질체의 세포질 불활성화를 위한 최적 IOA의 농도는 5 mM, 처리시간은 10분 정도로 처리하는 것이 세포의 손상을 최소화하고 융합에 적합한 조건임을 알 수 있었다(표 4-2).

표 4-2. 유채 원형질체 세포질 불활성화 조건

구분	유채			
	IOA 농도(mM)			
처리시간(분)	1	3	5	10
0	+	+	+	-
3	+	+	+	-
5	+	+	+	-
10	+	+	-	-

다. 브로콜리 원형질체의 세포질 불활성화 조건 확립

상기의 원형질체 세포질 불활성화 조건을 바탕으로 브로콜리 원형질체의 세포질 불활성화 조건을 확립하였다. 브로콜리의 경우 0, 1 mM, 3 mM 1분, 3분 처리구에서는 브로콜리 원형질체가 정상적으로 분열하여 1~2주 사이에 콜로니 단계까지 진행되었고 3 mM 5분 이상 5 mM 전체 처리구에서는 분열을 하지 못하고 찌그러지거나 죽은 세포들이 대부분 관찰되었다. 이상의 결과를 토대로 브로콜리 원형질체의 세포질 불활성화를 위한 최적 IOA의 농도는 3 mM, 처리시간은 5분 정도로 처리하는 것이 세포의 손상을 최소화하고 융합에 적합한 조건임을 알 수 있었다(표 4-3).

표 4-3. 브로콜리원형질체 세포질 불활성화 조건

구분	브로콜리			
	IOA 농도(mM)			
처리시간(분)	1	3	5	10
0	+	+	-	-
3	+	+	-	-
5	+	-	-	-
10	+	-	-	-

라. 배추 원형질체의 세포질 불활성화 조건 확립

상기의 원형질체 세포질 불활성화 조건을 바탕으로 배추 원형질체의 세포질 불활성화 조건을 확립하였다. 배추의 경우 0, 1 mM, 3 mM, 5 mM 3분 처리구까지는 배추 원형질체가 정상

적으로 분열하여 1~2주 사이에 콜로니 단계까지 진행되었고 5 mM 5분 이상, 10 mM 전체 처리구에서는 분열을 하지 못하고 찌그러지거나 죽은 세포들이 대부분 관찰되었다. 이상의 결과를 토대로 배추 원형질체의 세포질 불활성화를 위한 최적 IOA의 농도는 5 mM, 처리시간은 5분 정도로 처리하는 것이 세포의 손상을 최소화하고 융합에 적합한 조건임을 알 수 있었다 (표 4-4).

표 4-4. 배추 원형질체 세포질 불활성화 조건

구분	배추			
	IOA 농도(mM)			
처리시간(분)	1	3	5	10
0	+	+	+	-
3	+	+	+	-
5	+	+	-	-
10	+	+	-	-

3. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 융합체계 확립

무 원형질체의 핵 불활성화 조건과 양배추/유채/브로콜리/배추 원형질체의 세포질 불활성화 조건을 확립한데 이어 다음으로 두 작물 간 융합 체계를 확립하였다.

일반적으로 사용되는 원형질체 융합 방법으로는 고농도의 화학물질을 촉매로 사용하는 PEG 융합법과 일시적인 전기적 충격을 가해 융합하는 전기융합이 있는데 본 연구에서는 PEG 융합보다 비교적 원형질체 융합 빈도가 높고 재현성이 우수한 전기융합을 선택하였다. 상기에 확립된 무 핵 불활성화 기술과 십자화과 작물들의 세포질 불활성화 기술을 토대로 이들 식물체로부터 원형질체의 융합 체계를 확립하였다.

무와 십자화과 작물의 전기 융합 과정은 먼저 25~40 V/cm 세기로 20~30초 동안 교류를 통과 시켜 원형질체간의 사슬을 형성시킨 후 1,250~1400 V/cm 세기로 60 usec 동안 직류 전기충격을 주어 원형질체 융합을 실시하였다(그림 4-3).

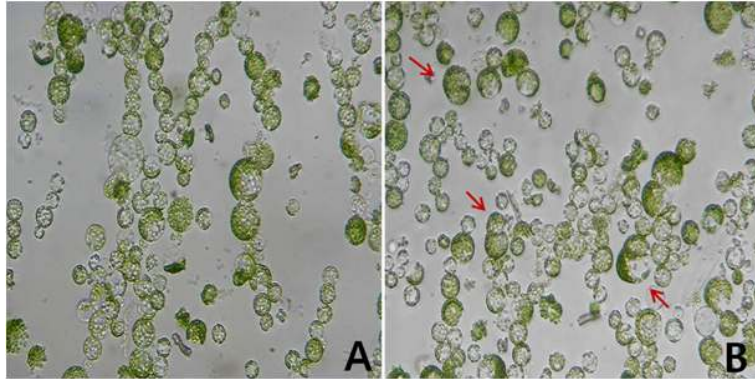


그림 4-3. 무와 유채의 원형질체 전기융합 과정. A: pearl chain 형성; B: 세포융합.

가. 무와 양배추 원형질체의 융합 체계 확립

약 1~2주일 무균 발아된 무식물체에 감마선을 300 - 500 Gy 세기로 조사하여 핵을 불활성화시킨 다음 자엽 약 1 g을 수거하여 CPW 13M (CPW salts + 13% mannitol) 용액에 1시간 전처리 한 다음 세포벽분해효소용액으로 16시간동안 25℃ 암배양을 하였다. 유리된 원형질체를 CPW 9M (CPW salts + 9% mannitol) 용액으로 3회 세척하고 전기융합 완충용액(0.5M mannitol, 0.5 mM CaCl₂, pH 5.8)으로 추가로 2회 세척 후 회수된 원형질체를 hemocytometer로 계수하고 융합밀도를 2x10⁵개로 조정하여 융합재료로 준비하였다.

무균 발아된 양배추 자엽을 약 1 g 수거하여 무 식물체와 같은 방법으로 원형질체를 분리하고 CPW9M 용액으로 2회 세척 후 3 mM IOA를 10분간 처리하여 세포질을 불활성화 시켰다. 전기융합 완충용액으로 2회 추가 세척하고 회수된 원형질체를 hemocytometer로 계수하고 융합밀도를 2x10⁵개로 조정하여 융합재료로 준비하였다.

무 원형질체와 양배추를 3:1의 부피비로 혼합하고 멸균 건조된 전기융합 챔버에 조심스럽게 분주하고 15분 정도 방치한 후 Electro cell manipulator (Model 2001 by BTX, Inc.) 장치에 연결하였다. 먼저 25~40 V/cm 세기로 20~30초 동안 교류를 통과 시켜 원형질체 사슬을 형성 시킨 후 1,250~1400 V/cm 세기로 60 usec 동안 직류를 통과 시켜 전기충격을 주어 융합시켰다. 융합된 원형질체를 조심스럽게 회수하고 원심분리 후 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L이 첨가된 NH₄NO₃ 제거 MS 배지에 희석하고 25℃ 암배양 하였다.

핵과 세포질이 효과적으로 불활성화 되어 있는지 여부는 감마선을 조사한 무에서 분리한 원형질체와 IOA로 처리한 양배추 원형질체를 융합처리 없이 단독으로 배양해서 세포 분열 여부를 관찰함으로써 검증하였으며 단독 배양의 경우 원형질체의 세포분열을 통한 무나 양배추 공히 세포증식은 이루어지지 않았다. 이 과정은 매번 융합과정에서 주기적으로 확인하였다.

무와 양배추가 융합된 세포는 배양 후 1주일 이내에 초기 세포분열을 거쳐 이후 배양과정에서 세포과 단계까지 분열하였고 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주

있더니 약 3-4 주 정도 배양 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다.

발달된 microcalli를 동일 조성의 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였으며 증식된 callus를 BA 2 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS 배지로 옮겨 배양한 결과 무와 양배추의 융합이 이루어진 callus로부터 shoot가 발달하였다(그림 4-4).

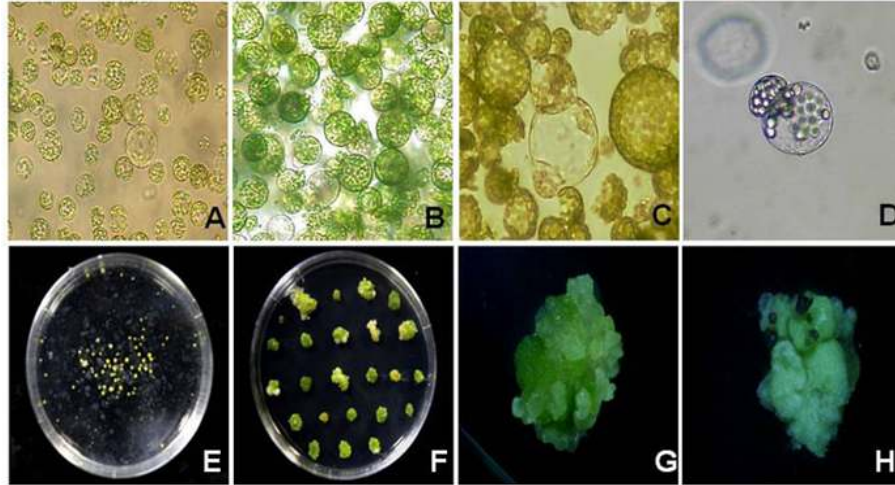


그림 4-4. 전기적 융합을 이용한 무와 양배추의 원형질체 융합 체계. A: Freshly isolated γ -ray irradiated radish protoplast; B: Cabbage protoplast pre-treated with IOA; C: Fusion cell; D: First cell division; E, F: Microcalli formation; G: Callus formation; H: Shoot induction from protoplast-derived green callus.

무와 양배추의 융합 원형질체 유래 callus들을 제 1세부 연구팀에 의뢰해 미토콘드리아와 엽록체를 분자 마커로 식별할 수 있었다. Data 분석에서 각 callus가 무와 양배추의 세포질이 비슷한 비율로 혼합되어 있다면 PCR 결과 2 band가 나와야 하는데 callus 10번은 대부분 무의 세포질을 가지고 있는 것으로 판명되었다(그림 4-5). 핵형 분석은 별도로 실시하였다.

본 연구에서 전기적 융합 방법을 이용해 무와 양배추의 원형질체를 효과적으로 융합하는 체계를 확립하였다. 본 원형질체 융합 및 배양체계는 다른 십자화과 작물들의 고효율 원형질체 융합 및 배양 시스템 확립을 위한 기본적인 연구 방법으로 활용할 수 있게 되었다.

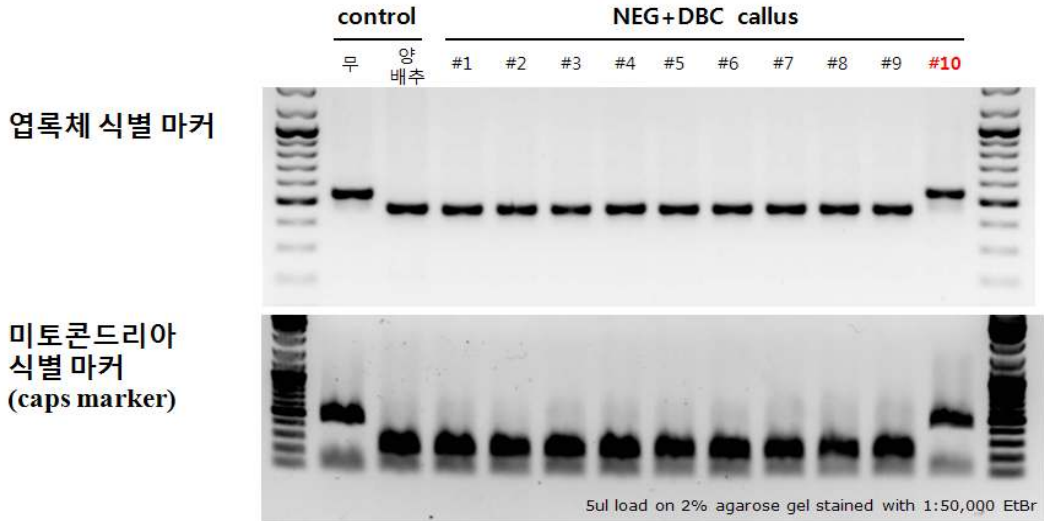


그림 4-5. Cybrid 미토콘드리아/엽록체기반 마커 식별.

나. 무와 유채 원형질체의 융합 체계 확립

상기의 무와 양배추의 융합 체계를 이용하여 무와 유채 원형질체의 융합 체계를 확립하였다. 융합 과정은 무와 양배추의 융합 과정과 동일하게 실행하였다. 감마선을 조사한 무 식물체의 원형질체를 분리하고 무균 발아된 유채 자엽에서 원형질체를 분리하여 5 mM IOA로 10분간 처리하여 세포질을 불활성화시킨 후 일정 비율로 혼합하여 전기융합 하였다. 융합된 원형질체는 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L이 첨가된 NH_4NO_3 제거 MS 배지에 희석 후 25°C 암배양 하였다.

감마선을 처리한 무에서 분리한 원형질체와 IOA로 처리한 유채 원형질체를 단독으로 배양해서 세포 분열 여부를 관찰하고 핵과 세포질이 효과적으로 불활성화 되었는지 매 융합마다 확인하였다. 무와 유채가 융합된 세포는 배양 후 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 콜로니 단계로 증식하였고 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다(그림 4-6).

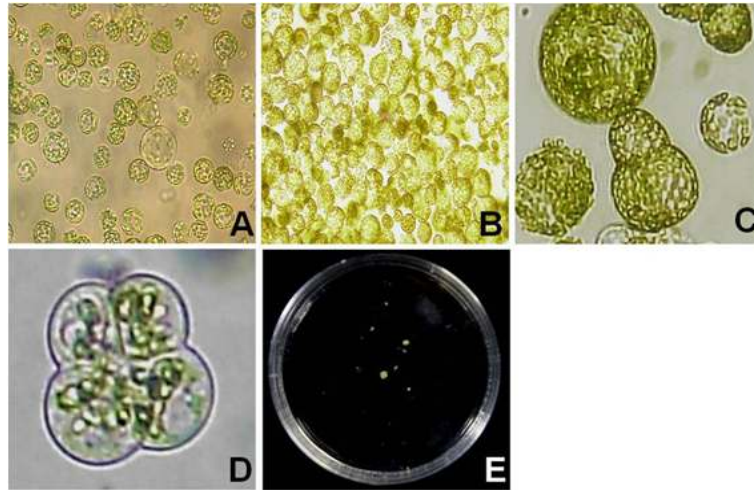


그림 4-6. 전기적 융합을 이용한 무와 유채의 원형질체 융합 체계. A: Freshly isolated γ -ray irradiated radish protoplast; B: Rapeseed protoplast pre-treated with IOA; C: Fusion cell; D: Second cell division; E: Microcalli formation.

다. 무와 브로콜리 원형질체의 융합 체계 확립

상기의 무와 양배추의 융합 체계를 이용하여 무와 브로콜리 원형질체의 융합 체계를 확립하였다. 융합 과정은 무와 양배추의 융합 과정과 동일하게 실행하였다. 감마선을 조사한 무 식물체의 원형질체를 분리하고 무균 발아된 브로콜리 자엽에서 원형질체를 분리하여 3 mM IOA로 5분간 처리하여 세포질을 불활성화 시킨 후 일정 비율로 혼합하여 전기융합 하였다. 융합된 원형질체는 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L이 첨가된 NH_4NO_3 제거 MS 배지에 희석 후 25°C 암배양 하였다.

감마선을 처리한 무에서 분리한 원형질체와 IOA로 처리한 브로콜리 원형질체를 단독으로 배양해서 세포 분열 여부를 관찰하고 핵과 세포질이 효과적으로 불활성화 되었는지 매 융합마다 확인하였다. 무와 브로콜리가 융합된 세포는 배양 후 약 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 2~3주 사이에 콜로니 단계로 분열하는 것을 관찰하였다(그림 4-7).

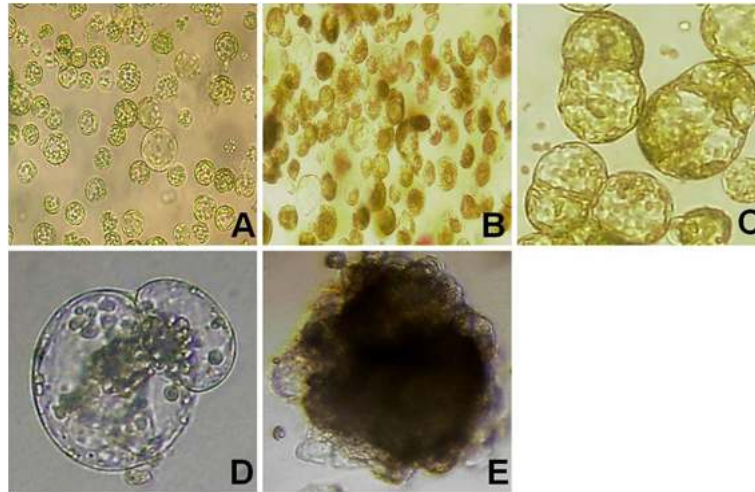


그림 4-7. 전기적 융합을 이용한 무와 브로콜리의 원형질체 융합 체계. A: Freshly isolated γ -ray irradiated radish protoplast; B: Broccoli protoplast pre-treated with IOA; C: Fusion cell; D: First cell division; E: Cell colony formation.

라. 무와 배추 원형질체의 융합 체계 확립

상기의 무와 양배추의 융합 체계를 이용하여 무와 배추 원형질체의 융합 체계를 확립하였다. 융합 과정은 무와 배추의 융합 과정과 동일하게 실행하였다. 감마선을 조사한 무 식물체의 원형질체를 분리하고 무균 발아된 배추 자엽에서 원형질체를 분리하여 5 mM IOA로 5분간 처리하여 세포질을 불활성화 시킨 후 일정 비율로 혼합하여 전기융합 하였다. 융합된 원형질체는 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L이 첨가된 NH_4NO_3 제거 MS 배지에 희석 후 25°C 암배양 하였다.

감마선을 처리한 무에서 분리한 원형질체와 IOA로 처리한 배추 원형질체를 단독으로 배양해서 세포 분열 여부를 관찰하고 핵과 세포질이 효과적으로 불활성화 되었는지 매 융합마다 확인하였다. 무와 배추가 융합된 세포는 배양 후 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 콜로니 단계로 분열하였고 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 2,4-D 0.5 mg/L와 BA 2 mg/L를 첨가한 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 신초를 유기하기 위해 유도된 callus를 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS agar 배지로 옮겨 배양하였다(그림 4-8).

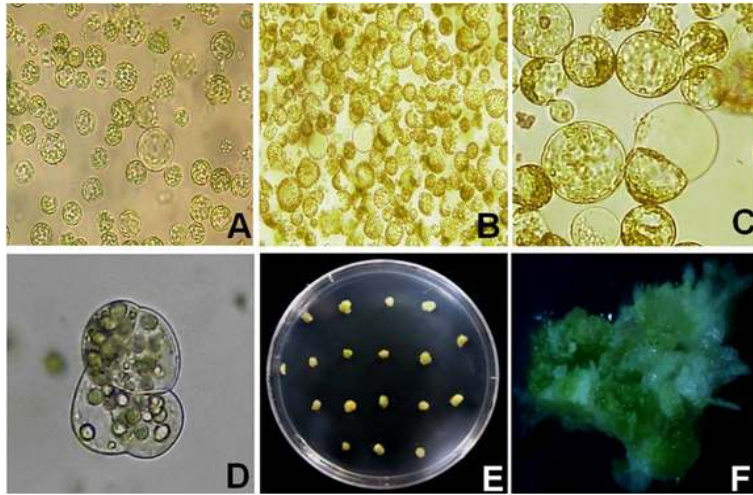


그림 4-8. 전기적 융합을 이용한 무와 배추의 원형질체 융합 체계. A: Freshly isolated γ -ray irradiated radish protoplast; B: Chinese cabbage protoplast pre-treated with IOA; C: Fusion cell; D: Second cell division; E: Microcalli formation; F: Shoot induction from protoplast-derived green callus.

4. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 융합효율 증대

2차 년도에 확립된 원형질체 융합 방법으로 융합 빈도가 높고 재현성이 좋아 융합 효율이 높은 전기 융합 체계를 이용해 상기에 확립된 무 핵 제거 기술과 십자화과 작물들의 세포질 불활성화 기술을 토대로 3차 년도에는 양배추/유채/브로콜리/배추 세포질용성불임 융합체를 개발하기 위해 무와 십자화과 4종 원형질체의 융합을 본격적으로 시행하였다. 또한 융합 효율 및 배양 세포의 분열 효율을 높이기 위해 핵 공여자(무)에 처리하는 방사선 세기 및 화학물질 첨가 유 무등 융합 과정에 관여하는 미세한 조건들을 규명하였다.

가. 무와 양배추 원형질체의 융합 효율 증대

무와 양배추 원형질체의 융합 과정은 전년도에 확립된 방법대로 시행하되 세부 조건을 조정하여 융합 및 배양 효율을 최대화 시키고자 하였다. 먼저 약 1~2주일 동안 무균 발아된 무식물체에 감마선을 0.3 ~ 0.5 kGy 세기로 조사하여 핵을 제거하고 자엽 약 1 g을 수거하여 CPW 13M (CPW salts + 13% mannitol) 용액에 1시간 전처리한 다음 세포벽분해효소용액으로 16시간동안 25℃ 암배양을 하였다. 유리된 원형질체를 CPW 9M (CPW salts + 9% mannitol) 용액으로 3회 세척하고 융합 버퍼(0.5 M mannitol, 0.5 mM CaCl₂, pH 5.8)로 추가로 2~3회 세척 후 회수된 원형질체를 hemocytometer로 계수하고 융합밀도를 2×10^5 개로 조정하여 융합재료로 준비하였다. 무균 발아된 양배추 자엽을 약 1g 수거하여 무식물체와 같은 방법으로 원형질체를 분리하고 CPW 9M 용액으로 2회 세척 후 3 mM IOA를 10분 전후로 처리하여 세포질을

불활성화 시켰다. 용합버퍼로 2~3회 추가 세척하고 회수된 원형질체를 계수하고 용합밀도를 2×10^5 개로 조정하여 용합재료로 준비하였다.

무 미토콘드리아의 형질이 효과적으로 전이될 수 있도록 무 원형질체 비율을 양배추 원형질체보다 3~4배 정도 높게 혼합하고 멸균 건조된 용합 챔버에 조심스럽게 분주하고 10~15분 정도 방치한 후 Electro cell manipulator (Model 2001 by BTX, Inc.) 장치에 연결하였다. 먼저 25~30V/cm 세기로 20~40초 동안 교류를 통과 시켜 원형질체 사슬이 충분히 형성할 수 있도록 한 후 1,250~1400V/cm 세기로 60 usec 동안 짧게 직류를 통과 시켜 전기충격을 주어 용합 시켰다. 직류 통과 직후 원형질체가 용합된 모습을 관찰할 수 있었다(그림 4-9). 직류, 교류 등 전기적 조건은 매 용합 시에 준비된 원형질체의 상태에 따라 미세 조정하여 전기 용합 과정에서의 효율을 높였다. 용합된 원형질체를 조심스럽게 회수하고 원심분리 후 양배추 배양에 최적 배지 조성인 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L이 첨가된 NH_4NO_3 free MS 배지에 희석하고 25°C 암배양 하였다. 매 용합마다 감마선을 조사한 무에서 분리한 원형질체와 IOA로 처리한 양배추 원형질체를 단독으로 배양해서 세포 분열 여부를 관찰하고 핵과 세포질이 효과적으로 불활성화 되었는지 확인하여 목적하는 세포질 융성불임 식물체를 획득할 수 있는 기회를 높이고자 하였다.

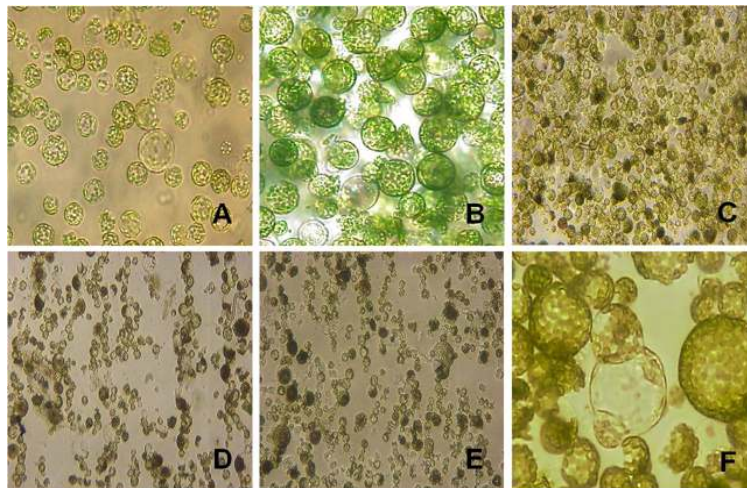


그림 4-9. 전기적 용합을 이용한 무와 양배추의 원형질체 용합 체계. A: 감마선 처리한 무 원형질체; B: IOA 처리한 양배추 원형질체; C: 용합전 무-양배추 원형질체; D: 교류 전류에서 원형질체 사슬 형성; E-F: 직류 전류에서 원형질체의 용합.

본 연구에서는 무 원형질체의 핵을 효과적으로 제거하기 위해 방사선을 조사하는 방법을 이용하였다. 방사선 조사는 한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소에서 Co60 감마선을 이용하였고 과중 후 약 2~3주 동안 기내 배양한 무 식물체에 일정 세기로 약 3시간 정도 조사하여

핵 제거를 시도하였다. 방사선의 세기가 높을수록 무 원형질체의 핵은 효과적으로 제거되지만 너무 높을 경우 식물체에 손상을 주어 융합 세포 배양 효율이 떨어질 수 있으므로 적절한 방사선 세기를 결정하는 것이 필요하다고 사료되어 다음과 같이 실험하였다. 감마선을 각각 300, 400, 500, 700, 1000, 1500 Gy 세기로 무 식물체에 조사하고 원형질체를 분리하여 양배추 원형질체와 전기 융합 후 2~3주 정도 배양하면서 융합 세포를 관찰하고 분열 효율을 조사하였다. 감마선을 300~500 Gy 세기로 조사한 경우에는 17~25% 정도의 분열 효율을 보였고 분열 후 콜로니 형성까지 정상적으로 진행되었으나 500 Gy 이상에서는 9~12% 정도로 분열 효율도 낮았고 특히 1000 Gy에서는 초기 분열을 한 세포도 콜로니 단계나 미세callus 형성 단계까지 분열하지 못하고 죽는 것을 관찰하였다(그림 4-10).

이로써 무 식물체에 손상을 주지 않으면서 핵을 제거하고 융합 효율을 증진시킬 수 있는 방사선 세기는 300~500 Gy 범위인 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 융합에 사용되는 적절한 방사선 세기를 300~500 Gy 정도로 결정하였다.

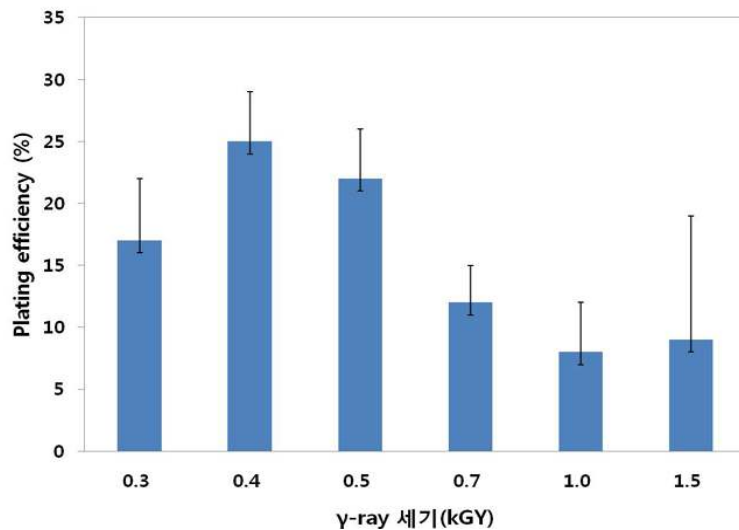


그림 4-10. 방사선 세기에 따른 무와 양배추 융합 원형질체 분열 효율.

또한 특정 화학 물질의 첨가가 배양 세포의 융합 효율을 높인다는 보고가 있어 별도 시험하였다. 특히 DMSO는 양극성이 있어 산화 물질과의 결합을 통해 식물체의 산화를 억제하고 감소시켜 식물세포에서 원형질체의 분열을 촉진해서 융합 세포의 배양 시 분열 효율을 높일 수 있다고 예상하고 다음과 같이 실험하였다. 융합 버퍼(0.5 M mannitol, 0.5 mM CaCl₂, pH 5.8)에 DMSO를 5% 농도로 혼합하여 준비하고 무 식물체에 감마선을 400 Gy 세기로 조사하고 원형질체를 분리 후 3X10⁵ 밀도로 조정하고 IOA 3 mM을 10분 처리한 양배추의 원형질체를 동일 농도로 조정 후 혼합하여 상기 방법과 동일하게 전기 융합을 시행하였다. 융합한 원형질

체를 5% DMSO를 3분간 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 각각 배양하고 2주 후에 융합 세포의 분열 효율을 측정하였다. 동일한 방법으로 2회 시행 하였을 때 5% DMSO를 처리한 군과 처리하지 않은 군의 분열 효율이 평균 13%, 12%로 비슷하게 나타나 세포 분열을 촉진해 융합 효율을 높일 것으로 예상했던 DMSO의 효과를 보지 못하였다(그림 4-11). 또한 이후 미세 callus 형성 단계에서도 뚜렷한 차이를 보지 못하였다. 그러나 DMSO의 첨가 농도에 따라서도 효과가 다를 수 있고 특히 shoot 형성의 경우에는 저농도에서 효과가 높다는 보고도 있어 본 연구에서 사용한 DMSO의 농도가 적정하지 않았을 수도 있다고 판단되어 향후 추가 연구에서 DMSO 농도별로 원형질체의 분열 효율 및 융합 효율을 조사하여 증진 효과를 보이는 적정한 농도 범위를 찾는 연구도 필요할 것으로 사료된다.

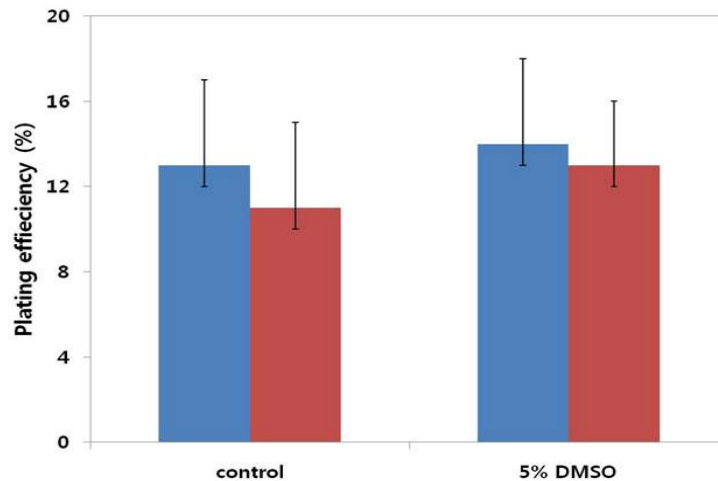


그림 4-11. DMSO 첨가가 무와 양배추 융합 원형질체의 분열 효율에 미치는 영향.

이상으로 무와 양배추를 이용하여 핵 공여자(무)에 조사하는 방사선 세기 조정 및 화학물질 (DMSO 등) 첨가, IOA 처리 시간 변화 등의 시험을 통해 무와 양배추의 융합 효율 증대 방안을 모색하였다. 아울러 전기적 조건과 융합 버퍼의 조성 및 pH, 원형질체의 밀도 및 혼합 비율 변화 등 제반 요건의 미세한 조건들을 다양하게 변경하면서 융합 세포를 관찰하고 효율이 높고 반복 재현성이 높은 융합 체계를 개발하였다.

나. 무와 유채 원형질체의 융합 체계 개발

상기의 무와 양배추의 융합 체계를 이용하여 무와 유채 원형질체의 융합 체계를 개발하였다. 융합 과정은 무와 양배추의 융합 과정과 동일하게 실행하였다. 감마선을 조사한 무 식물체의 원형질체를 분리하고 무균 발아된 유채 자엽에서 원형질체를 분리하여 5 mM IOA로 10~12분간 처리하여 세포질을 불활성화 시킨 후 무와 유채 원형질체를 3:1~4:1의 비율로 혼합하여 전기융합 하였다(그림 4-12). 직류, 교

류 등 전기적 조건은 매 융합 시에 준비된 원형질체의 상태에 따라 미세 조정하여 전기 융합 과정에서의 효율을 높였다. 융합된 원형질체는 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L이 첨가된 NH_4NO_3 free MS 배지에 희석 후 25°C 암배양 하였다. 감마선을 처리한 무에서 분리한 원형질체와 IOA로 처리한 유채 원형질체를 단독으로 배양해서 세포 분열 여부를 관찰하고 핵과 세포질이 효과적으로 불활성화 되었는지 매 융합마다 확인하였다. 유채의 경우 융합 과정에서 세포질 불활성화 농도의 조정이 가장 중요한 요건으로 고려되었다. 2차 년도에 규명한 세포질 불활성화 조건에서 보이듯 유채는 양배추, 브로콜리, 배추 같은 다른 십자화과 작물에 비해 세포질 불활성화 처리를 위해 첨가하는 IOA의 농도가 높고 시간이 길기 때문에 세포질 뿐 아니라 핵 손상도 수반될 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 불활성화 조건으로 규명된 농도와 처리 시간을 미세하게 조정하는 것이 중요하다. 특히 처리 시간의 경우 10분 이하로 처리한 경우에는 융합되지 않은 유채 자체 callus가 대부분 형성되었고 12분 이상 처리할 경우에는 융합된 세포들이 분열하지 않아 콜로니 형성이 되지 않는 경우가 많았다. 이상으로 전기적 융합 방법을 이용해 유채와 무의 원형질체를 효과적으로 융합하는 체계를 확립하였다.

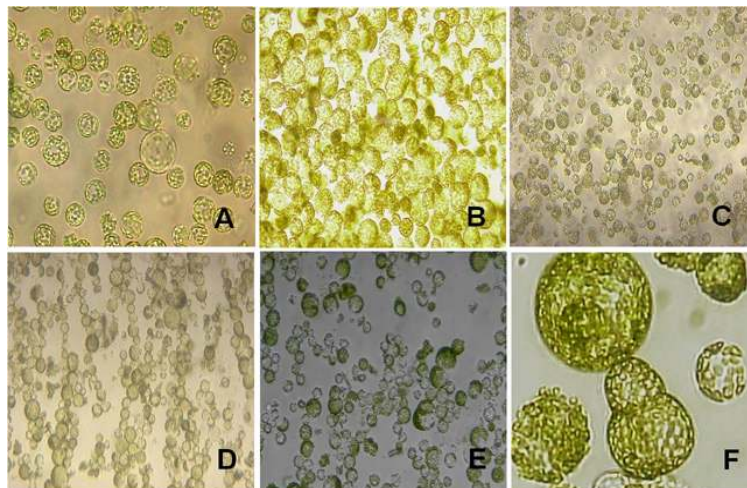


그림 4-12. 전기적 융합을 이용한 무와 유채의 원형질체 융합 체계. A: 감마선 처리한 무 원형질체; B: IOA 처리한 유채 원형질체; C: 융합전 무-유채 원형질체; D: 교류 전류에서 원형질체 사슬 형성; E-F: 직류 전류에서 원형질체의 융합.

다. 무와 브로콜리 원형질체의 융합 체계 개발

상기의 무와 양배추의 융합 체계를 이용하여 무와 브로콜리 원형질체의 융합 체계를 확립하였다. 융합 과정은 무와 양배추의 융합 과정과 동일하게 실행하였다. 감마선을 조사한 무 식물체의 원형질체를 분리하고 무균 발아된 브로콜리 자엽에서 원형질체를 분리하여 3 mM IOA로 7~8분 정도 처리하여 세포질을 불활성화 시킨 후 무와 브로콜리 원형질체를 3:1~4:1의 비율로 혼합하여 전기융합 하였다(그림

4-13). 직류, 교류 등 전기적 조건은 매 융합 시에 준비된 원형질체의 상태에 따라 미세 조정하여 전기 융합 과정에서의 효율을 높였다. 융합된 원형질체는 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L이 첨가된 NH_4NO_3 free MS 배지에 희석 후 25°C 암배양 하였다. 감마선을 처리한 무에서 분리한 원형질체와 IOA로 처리한 브로콜리 원형질체를 단독으로 배양해서 세포 분열 여부를 관찰하고 핵과 세포질이 효과적으로 불활성화 되었는지 매 융합마다 확인하였다. 브로콜리의 경우 타 작물에 비해 융합 효율 및 재현성이 낮았다. 동일 조건으로 융합을 시행해도 융합된 세포가 분열하여 콜로니 단계로 진행하는 것이 안정적으로 재현되지 않았다. 유채와 마찬가지로 세포질 불활성화 농도의 조정이 융합 과정에서 가장 중요한 요건으로 고려되었다. 2차 년도에 규명 한대로 브로콜리는 양배추, 유채, 배추 작물에 비해 세포질 불활성화 처리를 위해 첨가하는 IOA의 농도가 낮고 시간이 가장 짧기 때문에 세포질을 효과적으로 불활성화 시키는 것이 어려울 것으로 사료된다. 따라서 불활성화 조건으로 규명된 농도와 처리 시간을 미세하게 조정할 필요가 있다. 제시된 조건대로 5분간 처리한 경우에는 제대로 융합된 callus를 확보하기 어려웠고 8분 이상 처리한 경우에는 융합 세포가 분열하는 것을 관찰하기 어려웠다. 따라서 본 연구에서는 브로콜리의 세포질 불활성화를 위해 처리하는 IOA의 농도는 3 mM, 처리 시간은 7~8분 정도로 조정하여 융합을 시행하였다. 이상으로 전기적 융합 방법을 이용해 브로콜리와 무의 원형질체를 효과적으로 융합하는 체계를 확립하였다.

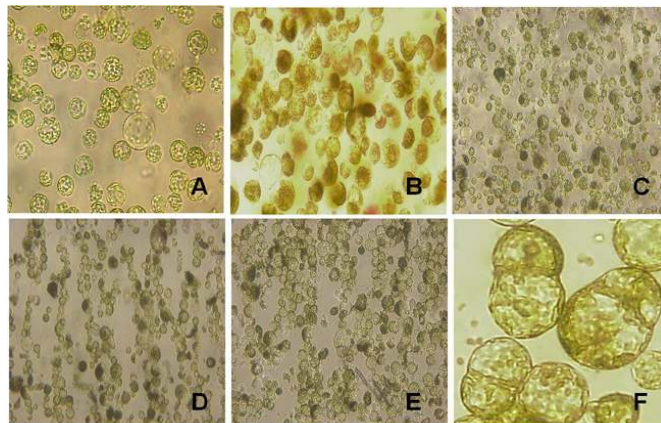


그림 4-13. 전기적 융합을 이용한 무와 브로콜리의 원형질체 융합 체계. A: 감마선 처리한 무 원형질체; B: IOA 처리한 브로콜리 원형질체; C: 융합전 무-브로콜리 원형질체; D: 교류 전류에서 원형질체 사슬 형성; E-F: 직류 전류에서 원형질체의 융합.

라. 무와 배추 원형질체의 융합 체계 개발

상기의 무와 양배추의 융합 체계를 이용하여 무와 배추 원형질체의 융합 체계를 확립하였다. 융합 과정은 무와 배추의 융합 과정과 동일하게 실행하였다. 감마선을 조사한 무 식물체의 원형질체를 분리하고 무균 발아된 배추 자엽에서 원형질체를 분리하여 5 mM IOA로 10분간 처리하여 세포질을 불활성화 시

킨 후 무와 배추의 원형질체를 3:1~4:1의 비율로 혼합하여 전기융합 하였다(그림 4-14). 직류, 교류 등 전기적 조건은 매 융합 시에 준비된 원형질체의 상태에 따라 미세 조정하여 전기 융합 과정에서의 효율을 높였다. 융합된 원형질체는 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L이 첨가된 NH_4NO_3 free MS 배지에 희석 후 25°C 암배양 하였다. 감마선을 처리한 무에서 분리한 원형질체와 IOA로 처리한 배추 원형질체를 단독으로 배양해서 세포 분열 여부를 관찰하고 핵과 세포질이 효과적으로 불활성화 되었는지 매 융합마다 확인하였다. 배추도 브로콜리와 유사하게 융합 효율 및 재현성이 낮았다. 동일 조건으로 융합을 시행해도 융합된 세포가 분열하여 콜로니 단계로 진행하는 것이 안정적으로 재현되지 않았다. 1차 년도에 규명한 대로 배추가 타 작물에 비해 배양 세포 분열 효율이 25~30% 정도로 가장 높은 것을 고려하면 핵은 손상시키지 않고 세포질만 불활성화 하는 것이 쉽지 않을 것으로 예상했다. 또한 배추 융합 세포가 온전히 분열하여 callus 단계까지 진행된다 해도 식물체 재분화도 어렵기 때문에 융합 효율을 최대한 높여 cybrid callus를 많이 확보하는데 중점을 두었다. 배추는 원형질체의 분리가 쉽고 분리된 원형질체의 상태도 양호한 것이 장점으로 융합 재료로 적당하다. 그러나 세포질 불활성화 후 융합한 세포는 예상한대로 쉽게 분열하지 않았고 재현성도 낮았다. 이는 세포질 불활성화 단계에서 세포 손상이 심화되어 분열에도 영향을 미치기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 불활성화 조건으로 규명된 농도와 처리 시간을 미세하게 조정할 필요가 있었다. 당해 연도 초기에는 2차 년도에 확립된 조건대로 세포질 불활성화를 위한 IOA 농도는 5 mM로 처리 시간은 5분으로 시행하였다. 그러나 5분에서 10분미만으로 처리한 경우에는 callus를 확보해도 제대로 융합된 cybrid callus가 없었고 10분 이상 처리한 경우에는 융합 세포가 분열하는 경우가 적었다. 따라서 적절한 배추의 세포질 불활성화 조건을 5 mM IOA 10분으로 조정하여 일정하게 융합을 시행하였다. 이상으로 전기적 융합 방법을 이용해 배추와 무의 원형질체를 효과적으로 융합하는 체계를 확립하였다.

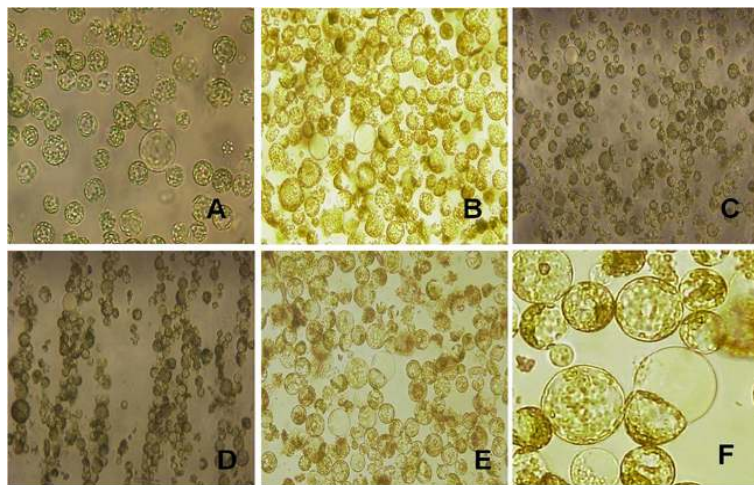


그림 4-14. 전기적 융합을 이용한 무와 배추의 원형질체 융합 체계. A: 감마선 처리한 무 원형

질체; B: IOA 처리한 양배추 원형질체; C: 융합전 무-양배추 원형질체; D: 교류 전류에서 원형질체 사슬 형성; E-F: 직류 전류에서 원형질체의 융합.

제 5 절. Donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 융합 원형질체로부터 cybrid 식물체 재생 기술 개발

상기의 원형질체 융합 조건 규명, 배양체계 및 원형질체 융합체계를 이용하여 각 작물별로 원형질체 융합 cybrid 식물체 재생 체계를 확립하였다. 아울러 원형질체 융합 후 콜로니, callus 단계를 거쳐 식물체로 재생되어 최종 순화된 식물체를 확보하기까지는 시간이 오래 걸리고 callus 및 식물체 유지 및 관리에 드는 노력과 비용이 많이 들기 때문에 이를 단축하고 보다 효율적으로 cybrid를 선별하기 위해 식물체가 아닌 callus 단계에서 분자마커로 핵과 세포질을 도입여부를 분석해서 조기에 cybrid 선별하고자 하였다. 또한 특히 재분화가 어려운 작물, 예로 배추의 경우 배지 구성에 화학 물질을 첨가하거나 신규 종자 라인의 식물체 재분화 조건 시험 등을 통해 식물체 재생 효율을 높일 수 있는 요인들을 추가적으로 규명하고자 하였다.

1. 무와 양배추 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발

무와 양배추가 융합된 세포는 배양 후 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 콜로니 단계까지 분열하였고 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 2차 년도에 자엽 재분화 조건 시험을 통해 선택된 배지 구성으로 BA 2 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS, gelrite 0.4% 배지로 옮겨 신초를 유도하였다(그림 5-1).

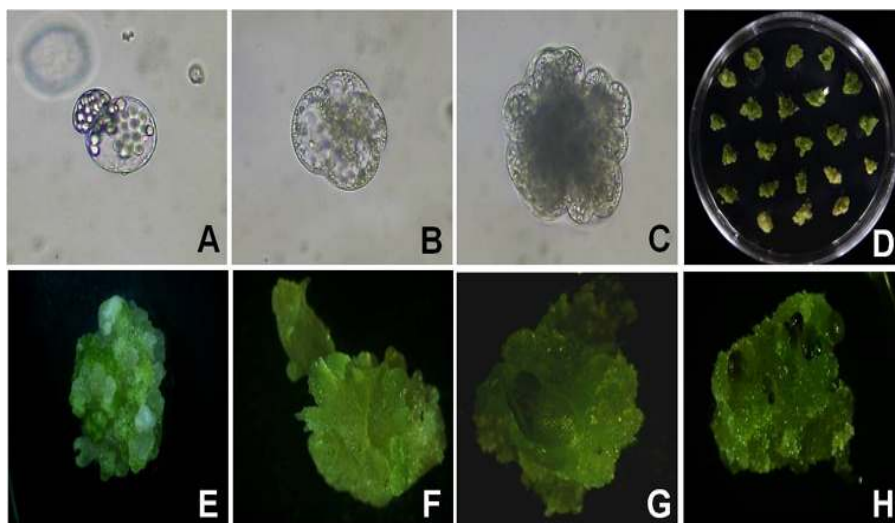


그림 5-1. 무와 양배추 융합 원형질체 재생체계 확립. A: The first cell division of fusion cell; B: The second cell division; C: Cell colony formation; D: Micocalli formation; E: Shoot induction from green callus; F-H: Soot regeneration.

무와 양배추 융합 세포는 초기 분열부터 콜로니, callus 형성 단계를 거쳐 싹 형성과 뿌리 형성으로 이어지는 전 과정이 타 작물에 비해 안정적이며 재현성이 양호하였다. 양배추의 경우 융합된 세포의 callus 확보가 용이하고 제 1세부 연구팀에서 구축한 분자마커 시스템으로 cybrid 선별 시 무 세포질을 가진 cybrid callus가 가장 많이 선별되었다. 그러나 양배추 단독 배양에 비해서는 싹 분화까지 callus 유지가 쉽지 않았고 갈변되어 죽는 callus가 많았다. 특히 cybrid로 선별된 callus의 경우에는 수분이 많아 무른 편이고 색상도 녹색을 띄지 않고 무색에 가까운 경우가 많아 싹 형성을 위해 green callus로 발달하기까지 시간이 오래 걸리고 유지가 어려웠다. 분자마커를 이용하여 cybrid 여부를 조사한 결과 무 세포질과 양배추 핵을 가진 cybrid callus 라인은 14개이고 그 중 10개는 무(DCGMS) 미토콘드리아만 가지고 있는 cybrid callus로서 옹성불임 식물체로 재생될 경우 상업 육종에 활용이 가능한 자원이 될 것으로 예상하고 있다(그림 5-2).

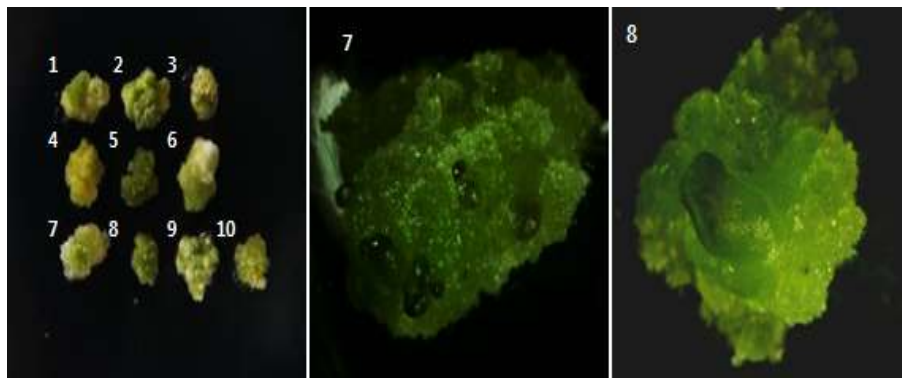


그림 5-2. 무와 양배추 융합 원형질체 유래 cybrid callus 및 싹 유도.

2. 무와 유채 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발

상기의 양배추 융합 원형질체 배양 및 재생체계를 이용하여 무와 유채의 융합 원형질체 재생 체계를 개발하였다(그림 5-3). 무와 유채가 융합된 세포는 배양 후 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 콜로니 단계로 분열하였고 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS, 0.8% agar 배지로 옮겨주어 싹을 유도하였다.

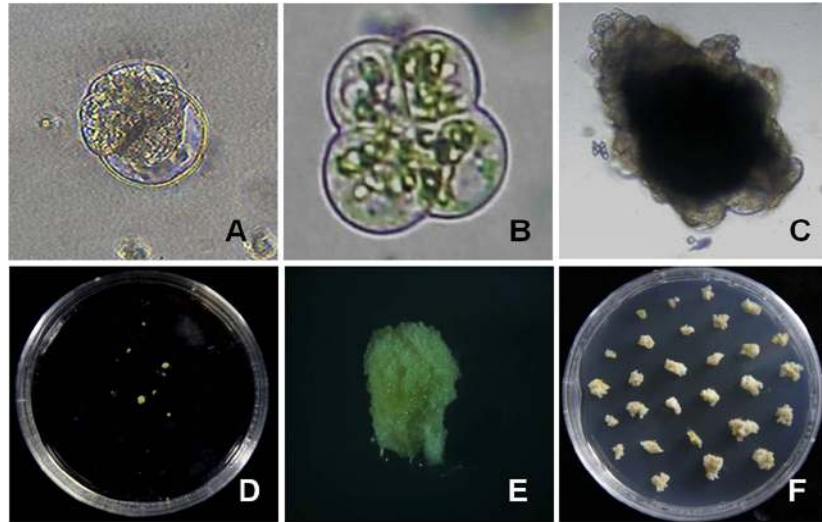


그림 5-3. 무-유채 융합원형질체 재생체계 확립. A: The first cell division of fusion cell; B: The second cell division; C: Cell colony formation; D: Microcalli formation; E: Callus formation; F: Soot induction from calli.

2차 년도에 유채 explant를 이용한 재분화 조건 시험 시 2 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA를 혼용한 배지 조건에서 40% 정도 shoot가 관찰되어 유채의 기본 재분화 조건으로 얻었다. 그러나 이 결과를 토대로 유채 원형질체로부터 얻은 callus를 동일 조성의 배지 조건에 옮겨 싹을 유도했으나 callus만 증식하였고 분화가 되지 않았다. 자엽에서 유래된 유채 callus와 원형질체 배양을 통해 얻어진 유채 callus의 재분화 조건이 동일하지 않음을 확인하고 융합과 별도로 유채 원형질체를 6% myo-inositol, 1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA이 혼용되어 첨가된 NH_4NO_3 free MS 배지에 배양해서 얻은 콜로니를 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS, 0.8% agar 배지로 옮겨주었더니 싹이 유되었다. 따라서 무와 유채 융합 callus를 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS, 0.8% agar 배지 조건을 기본으로 재분화를 유도 하였다.

상기의 융합 과정에서 언급한대로 무와 유채의 융합은 세포질 불활성화를 위한 IOA의 고농도, 장시간 처리로 인해 융합 효율이 낮아 callus 확보가 어려운 편이다. 3차 년도까지 분자마커 분석을 통해 무 세포질과 유채 핵을 가진 cybrid callus로 검증되어 유지하고 있는 라인은 1개이고 그것마저도 callus가 갈변되거나 노화되어 재생이 쉽지 않은 상태에 있다(그림 5-4).

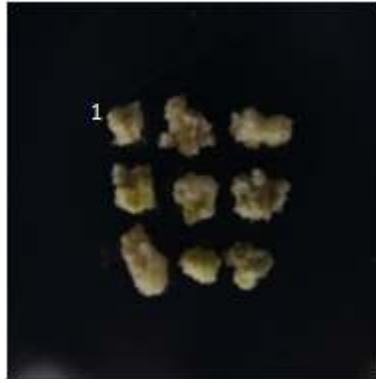


그림 5-4. 무와 유채 융합 원형질체 유래 cybrid callus.

3. 무와 브로콜리 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발

상기의 양배추 융합 원형질체 배양 및 재생체계를 이용하여 무와 브로콜리의 융합 원형질체 재생 체계를 개발하였다(그림 5-5). 무와 브로콜리가 융합된 세포는 배양 후 약 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 2~3주 사이에 콜로니 단계로 분열하였다. 이를 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨주었더니 약 3-4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 2,4-D 0.5 mg/L와 BA 2 mg/L를 첨가한 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 Zeatin 2 mg/L, IAA 0.2 mg/L, GA₃ 0.03 mg/L가 첨가된 MS 0.4% gelrite 배지로 옮겨주었더니 싹초가 유도되었다. 유기된 싹초는 성장조절제를 제외한 1/2 MS 배지에 옮겨 뿌리 형성을 유도하였다.

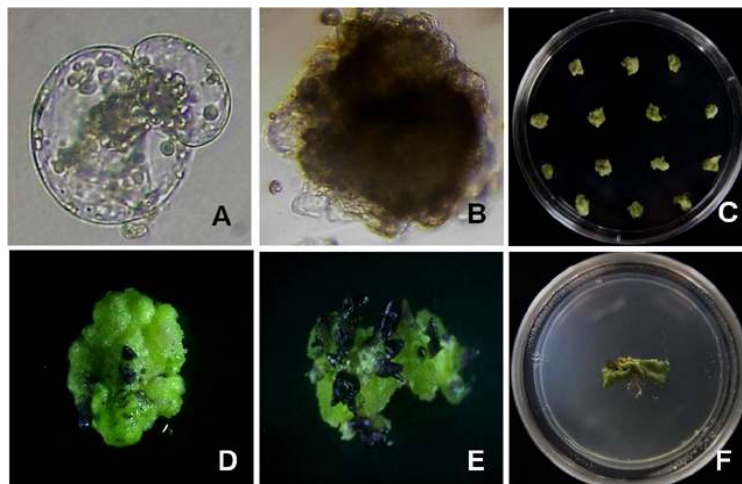


그림 5-5. 무-브로콜리 융합 원형질체 재생체계 확립. A: The first division of fusion cell; B: Cell colony formation; C: Calli formation; D-E: Shoot induction from green callus; F: Root formation from shoot regeneration.

상기의 융합 과정에서 기술한대로 브로콜리의 경우 타 작물에 비해 융합 효율 및 재현성이 낮아 callus 확보가 일정하지 않은 것이 문제점이다. 특정 융합 과정에서 대량 확보한 융합 callus의 경우 분자마커 분석 결과 대부분 브로콜리 단독 형질을 가진 것이었다. 현재 무 세포질과 브로콜리 핵을 가진 cybrid callus로 검증되어 유지하고 있는 라인은 1개이고 최근 shoot, root가 유도되어 재생된 식물체를 획득하였다(그림 5-6). 향 후 성체 식물체로 순화하여 화기 구조 및 원예적 특성 검정을 진행할 예정이다.



그림 5-6. 무와 브로콜리 융합 원형질체 유래 cybrid callus 및 신초 유도.

4. 무와 배추 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발

배추의 경우 genotype에 따라 재분화율에 차이가 많으므로 현재 융합에 사용하고 있는 장미 배추 외에 효율이 높은 품종을 추가로 확보하기 위해 제 1세부 연구팀에서 분양 받은 금진주, 황성 배추 종자와 시중에 판매하고 있는 서울 배추 종자를 구입하여 배추 재분화 조건을 탐색하였다. 배추 3종의 자엽 및 배축 절편을 이용해 MS 기본배지에 BA (0, 1, 2, 5, 10 mg/L)와 NAA (0.5 mg/L)가 농도별로 조합된 5 종류의 배지에 품종 별로 자엽과 배축을 각각 10개씩 세 개 plate에 치상한 후 약 4~6주 정도 배양하고 shoot 형성률을 조사하였다. 그 결과 NAA 단독 배지를 제외한 모든 혼용 배지에서 2-3주 안에 shoot가 나오는 것을 관찰하였다. 전년도 조건 시험에서 장미 배추의 자엽이 1 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA를 혼용한 배지 조건에서 70% 이상 shoot가 유도되어 분화율이 높았던 것에 비하면 황성 배추는 NAA 단독 배지와 10 mg/L BA에서는 전혀 분화가 일어나지 않았고 1, 2, 5 mg/L BA 모두에서 10% 미만으로 분화율이 낮았다. 금성 배추는 2 mg/L BA에서 27%로 가장 높았고 다음으로 10 mg/L BA에서 23%, 1 mg/L BA 13%, 5 mg/L BA에서 3%로 가장 낮았다. 서울 배추는 전 농도에서 10% 미만의 낮은 효율을 나타내 BA와 NAA의 혼용 조건에서는 재분화가 어려울 것으로 판단되었다(그림 5-7).

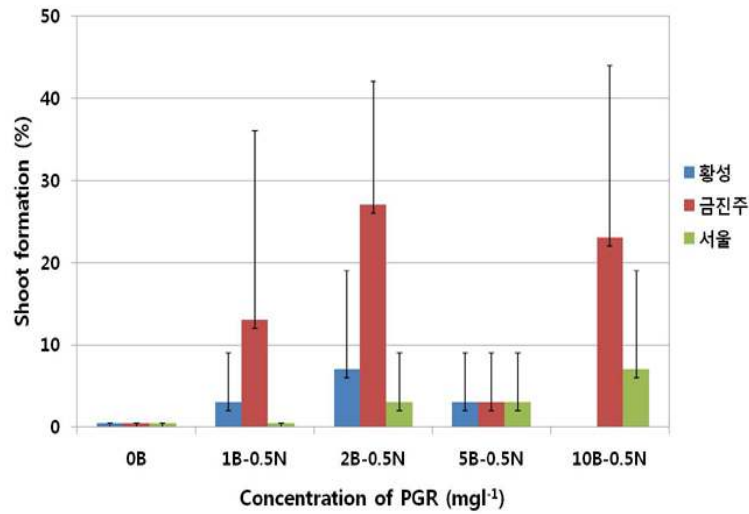


그림 5-7. 배추 품종별 자엽 explant 재분화 조건 시험.

배추의 하배축 배양을 통한 shoot 형성율을 비교해 보면 3품종 모두 자엽보다 비교적 높은 효율을 보였다. 황성 배추는 NAA 단독 배지와 2 mg/L BA를 제외하면 전 배지 조성에서 20% 이상 분화했고 1 mg/L, 10 mg/L BA에서 33%, 5 mg/L BA에서 27%의 분화율을 나타냈다. 금성 배추의 경우 NAA 단독 배지를 제외하고 전 배지 조성에서 20% 이상 고른 분화율을 나타냈다. BA 농도별로는 2 mg/L에서 33%로 가장 높았고 다음으로 1 mg/L에서 27%, 5 mg/L, 10mg/L에서 20%로 같았다. 서울 배추는 자엽의 분화율이 10% 미만이었던 것에 비해 배축은 1 mg/L BA를 제외하고는 전 농도에서 10% 이상이었고 특히 5 mg/L, 10 mg/L BA 농도에서 17%로 높게 나타났다.(그림 5-8).

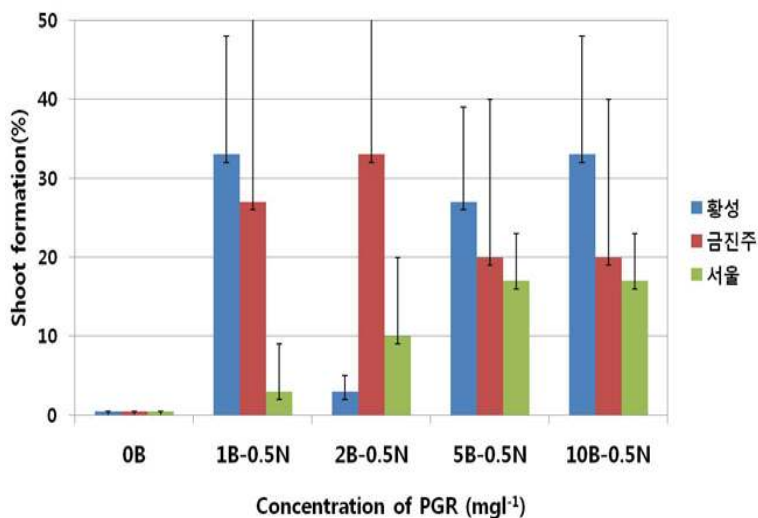


그림 5-8. 배추 품종별 배축 explant 재분화 조건 시험.

이상으로 황성, 금진주, 서울 등 신규 배추 품종의 재분화 조건 시험을 시행하였다. 배추 융합의 재료로 주로 사용하는 부위는 자엽으로 재분화 효율이 높은 배지 조성을 탐색하여 현재 융합 재료로 사용하고 있는 장미 배추 외에 shoot 형성 능력이 좋은 신규 품종 라인을 추가로 확보하여 배추 융합 callus의 재분화 효율을 높이고자 하였으나 황성, 서울 두 품종은 BA와 NAA 혼용 배지에서 재분화 효율이 10% 미만으로 모두 낮았고 금진주의 경우에는 최고 분화율도 30% 미만이어서 융합 재료로 사용하기에는 적합하지 않다는 것을 규명하였다.

특정 화학 물질의 첨가가 융합 callus의 재분화 효율을 높인다고 보고가 있다. DMSO는 산화 물질과의 결합을 통해 식물체의 산화를 억제하고 산화 물질을 감소시켜 식물세포에서 세포분열을 촉진하고 융합 세포 유래 callus의 재생 효율을 높일 수 있을 것으로 예상하였다. 따라서 배추 자엽 및 하배축으로부터 식물체 재분화 효율에 미치는 DMSO의 영향을 관찰하기 위해서 2 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA가 첨가된 MS agar 배지와 1% DMSO가 첨가된 배지로 구분하여 준비하고 장미 배추의 자엽과 하배축 절편을 각각 10개 씩 양쪽 배양 배지 조건에 치상하고 세 번 반복하였다. 25℃에서 명배양하면서 4주 동안 관찰하고 shoot 형성율을 조사하였다. 배양 2주 후에는 DMSO 처리군에서 자엽, 배축의 재분화율이 각각 13, 10%를 무처리군은 10, 17%로 나타나 무처리군의 배축 분화율이 약간 높았으나 배양 4주 후에 관찰했을 때는 DMSO 처리군에서 자엽, 배축의 재분화율이 17%, 53%를 무처리군은 20%, 50%로 나타나 두 군간의 차이를 볼 수 없었다(표 5-1). 그러나 DMSO의 첨가 농도가 shoot 형성에 영향을 미치며 특히 저농도에서 재분화 효과가 높고 고농도에서는 오히려 억제한다는 보고가 있어 본 연구에서 사용한 DMSO의 농도가 적정하지 않았을 수 있다고 사료된다. 향후 추가 연구에서 DMSO 농도별로 explant나 원형질체 유래 callus의 재분화 효율을 조사하여 증진 효과를 보이는 적정한 농도 범위를 찾는 연구도 필요할 것으로 사료된다.

표 5-1. DMSO 첨가가 장미배추 자엽 및 하배축의 재분화 효율에 미치는 영향

구분	배양 2주 후 shoot formation(%)			
	control		1% DMSO	
농도(mg/L) 2 BA-0.5 NAA	Cotyledon	Hypocotyl	Cotyledon	Hypocotyl
	10	17	13	10
	배양 4주 후 shoot formation(%)			
	Control		1% DMSO	
	Cotyledon	Hypocotyl	Cotyledon	Hypocotyl
	20	50	17	53

상기의 양배추 융합 원형질체 배양 및 재생체계를 이용하여 무와 배추의 융합 원형질체 재생 체계를 개발하였다(그림 5-9). 무와 배추가 융합된 세포는 배양 후 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 콜로니 단계로 분열하였고 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨 주었더니 약 4 주 정도 후에 microcalli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 2,4-D 0.5 mg/L와 BA 2 mg/L를 첨가한 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA 5 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS 0.8% agar 배지로 옮겨 약 1달 정도 신초를 유도한 후 zeatin 0.2 mg/L가 첨가된 MS B5 0.8% agar 배지로 다시 옮겨 2차로 신초를 유도하였다. 2차 이식 후 약 1달 후에 무와 배추 융합 callus에서 유래한 신초가 유도되었다. 유도된 신초를 성장조절제를 제거한 1/2 MS 기본 배지에 옮겨 주었더니 뿌리가 형성되었고 IBA 0.3 mg/L가 첨가된 1/2 MS 기본 배지로 옮겨 뿌리 증식을 유도하였다.

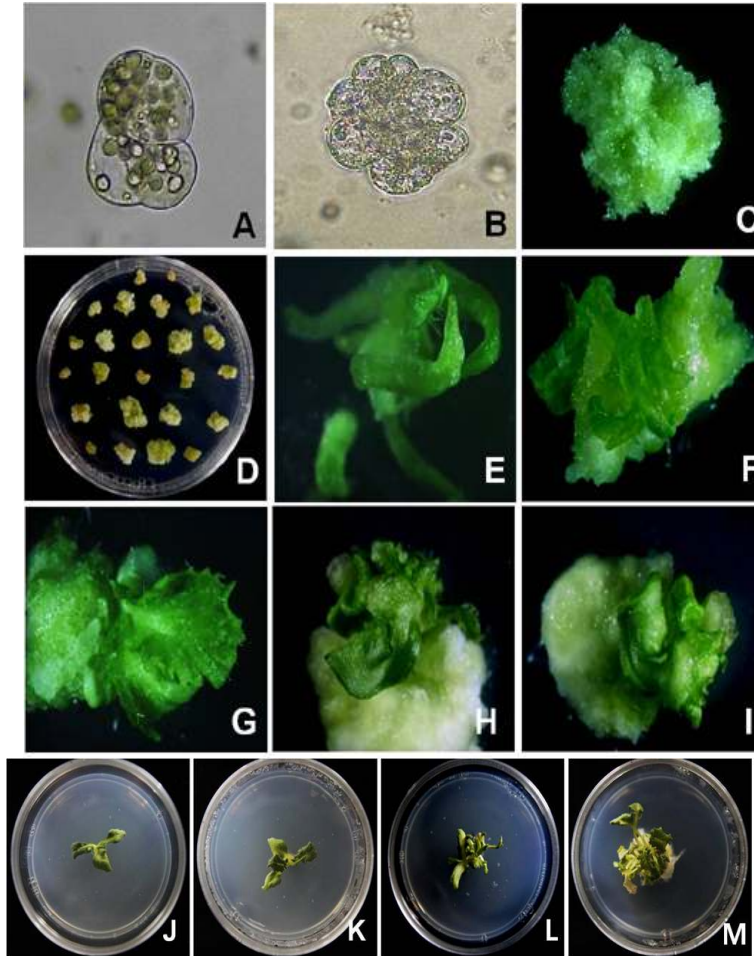


그림 5-9. 무-배추 융합 원형질체 재생체계 확립. A: The first cell division of fusion cell; B: Cell colony formation; C: Microcallus formation; D: Calli formation; E~I: Shoot induction from green callus; J~L: Root induction from shoot regeneration; M: Chinese cabbage cybrid plant formation from regenerate plantlet.

분자마커 분석을 통해 현재 보유하고 있는 무 세포질과 배추 핵을 가진 cybrid callus 라인은 3개이고 그 중 2개는 무 미토콘드리아만 가지고 있는 cybrid callus이다. 최근 callus 1개 라인에서 shoot, root가 형성되어 식물체가 재생된 것을 관찰하였고 뿌리 증식을 유도하였다(그림 5-10). 향후 식물체로 순화하여 화기 구조 및 원예적 특성 검정을 진행할 예정이다. 특히 배추의 경우 상업적으로 활용할 수 있는 응성불임 자원이 거의 없는 실정이기 때문에 성공적으로 응성불임 배추가 개발되어 진다면 상업적 가치가 매우 클 것으로 예상되고 있다.



그림 5-10. 무와 배추 융합 원형질체 유래 cybrid callus 및 신초 유도.

5. Donor(무) 와 recipient(양배추/유채) 융합 원형질체로부터 식물체 재생 효율 증대

기내에서 배양중인 cybrid plant를 육종의 중간모본으로 직접적으로 활용하기 위해서는 다수의 cybrid plant 확보가 필수적이다. 따라서 확립된 안정적인 원형질체 융합 체계를 이용해 목적하는 cybrid plant를 다수 생산하고자 하였다. 따라서 양배추, 유채, 브로콜리, 배추 등 4종의 연구대상 작물 중에서 타작물에 비해 융합 및 재분화 효율이 높고 재현성이 좋아 cybrid 확보가 용이한 양배추를 우선으로 대량 생산하고 또한 cybrid 식물체가 개발될 경우 종자시장에서 상업적 효용 가치가 큰 유채를 선택해서 집중적으로 원형질체 융합 연구를 수행하였다. 또한 유채의 경우 삼투조절제 탐색과 신규 후보 종자 선발 등 cybrid 식물체 재생 효율을 높일 수 있는 요인들을 추가적으로 규명하였다.

가. 무와 양배추 융합 원형질체의 재생 효율 증대

무와 양배추 융합 세포는 초기 분열부터 콜로니, callus 형성 단계를 거쳐 신초 형성과 뿌리 형성으로 이어지는 전 과정이 타 작물에 비해 비교적 안정적이며 재현성이 양호하였다. 현재까지 본 연구팀에서 보유하고 있는 무와 양배추 cybrid 식물체는 무 세포질과 양배추 핵을 가진 cybrid로 선별된 것으로서 모두 무 미토콘드리아만 가지고 있는 cybrid callus이다. 따라서 이로부터 재생된 식물체가 옹성불임 형질을 가진 양배추 식물체로 확인 된다면 상업적 가치가 클 것으로 기대하고 있다. 기내에서 배양중인 cybrid plant를 육종의 중간모본으로 직접 활용하기 위해서는 다수의 cybrid plant 확보가 필수적이다. 따라서 확립된 안정적인 원형질체 융합 체계를 이용해 목적하는 cybrid plant를 다수 생산하고자 하였다. 따라서 전년도에 재생된 식물체의 경우에도 callus를 계대 배양을 통해 지속적으로 유지하면서 다수의 융합 식물체를 확보하고자 하였다. 기존에 선별된 무와 양배추의 cybrid callus 중에서 이미 2개 라인에서는 신초

가 형성되었고 안정적으로 cybrid 식물체로 분화하였다(그림 5-11). 생산된 총 8개 cybrid 식물체의 경우에는 F₁ 중간 모본으로 사용할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 제 1세부 연구팀에 바로 전달되어 융성불임성, 저온 황화현상 등 cybrid 식물체 원예특성을 조사하였다.

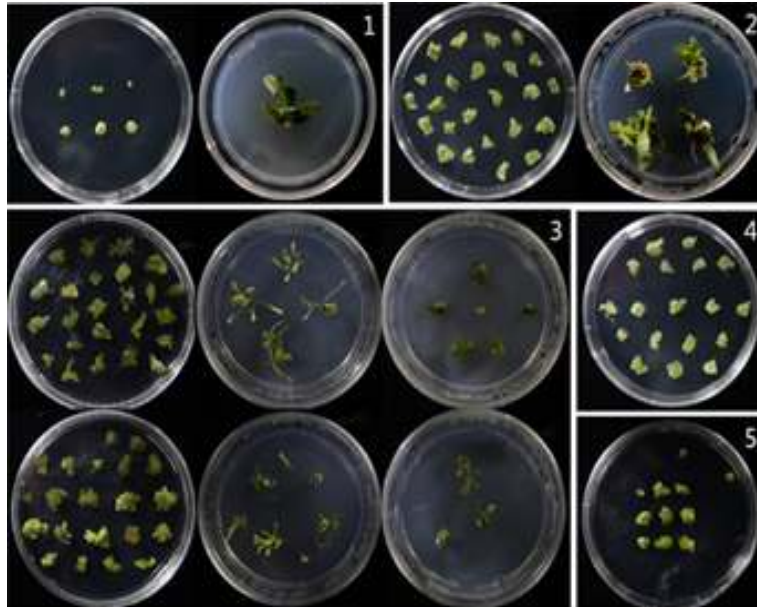


그림 5-11. 무와 양배추 융합 원형질체 유래 cybrid 식물체 보유 현황.

확립된 안정적인 무와 양배추 융합 체계를 기본으로 융합 및 재생 효율을 보다 최적화하여 다수의 cybrid 식물체를 확보하는데 주력하였다. Cybrid line으로 검증되어 어렵게 분화시켜 온전한 식물체를 생산했어도 원예적 특성 검사에서 부적합 판정을 받아 육종 모본으로 사용할 수 없는 경우가 종종 발생하기 때문에 가능한 한 많은 개체를 생산해야만 육종현장에서 목적하는 cybrid 식물체를 획득할 수 있는 기회를 높일 수 있다. 현재 본 연구팀에서 보유하고 있는 cybrid 식물체 라인(그림 5-12)은 제 1세부 연구팀에 전달되어 융성불임성, 저온 황화현상 등 다양한 원예 특성 조사를 거쳐 최종 모본으로 사용할 수 있는지 여부를 지속적으로 조사하고 있다.

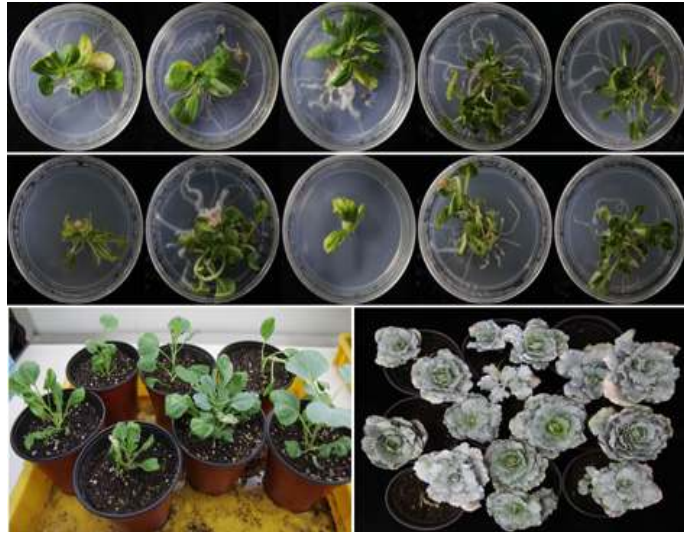


그림 5-12. 무와 양배추 융합 원형질체 유래 cybrid 식물체 재생 및 생산 증대.

나. 무와 유채 융합 원형질체의 재생 효율 증대

융합된 유채 원형질체로부터 식물체 재생 효율을 높이기 위해서는 우선 융합 세포의 배양 시 분열 효율을 높여 콜로니를 대량 확보하고 이들이 callus를 거쳐 결국 재생 식물체를 많이 획득하는 것이 필요하다. 따라서 유채 융합 세포의 분열 효율을 높이기 위해 배양 배지에 첨가되는 새로운 삼투조절제의 조건을 탐색하고 첨가 조건을 규명하였다.

Trehalose는 2분자의 D-글루코오스가 결합한 비환원성 이당류로서 균, 효모에 다량 존재하고 식물에서는 선인장에 특히 많이 함유되어 있다. 주로 곤충류의 에너지원이나 저장 탄수화물로서 중요한 역할을 담당하고 건조 및 동결에 대한 보호 작용으로 식품, 화장품 및 의약품 등에서도 다양하게 응용되는 물질이다. 따라서 식물 조직배양에도 이를 활용할 수 있을 것으로 예상하고 우선 원형질체 배양 시 첨가하여 분열 효율을 높이는지 관찰하였다. 만일 trehalose가 원형질체 세포 분열 효율을 높인다면 융합 세포의 경우에도 적용되어 결과적으로 융합 세포의 재생 효율을 증진할 수 있을 것으로 기대하였다.

원형질체 배양 시 배지에 주로 첨가되는 삼투조절제로는 mannitol과 myo-inositol이 주로 사용되고 있다. 이들의 최적 첨가 조건은 1차 년도에 이미 규명된 대로 mannitol은 9%, myo-inositol은 6%를 사용하고 trehalose는 적정 농도를 규명하기 위해 3, 6, 9%로 농도를 달리하여 MS 배지에 각각 첨가하였다. 유채 자엽에서 분리한 원형질체의 밀도를 2×10^5 개/ml로 조정 후 각 조건 배지에 넣어 암배양하면서 세포의 분열 모습을 관찰하였다. 관찰 결과 3%, 6% trehalose가 첨가된 처리구에서는 세포가 찌그러지면서 분열하지 못하고 사멸하였고 9% trehalose 처리구에서만 정상적으로 1, 2 단계 분열을 거쳐 생존하는 모습이 확인되었다(그림 5-13).

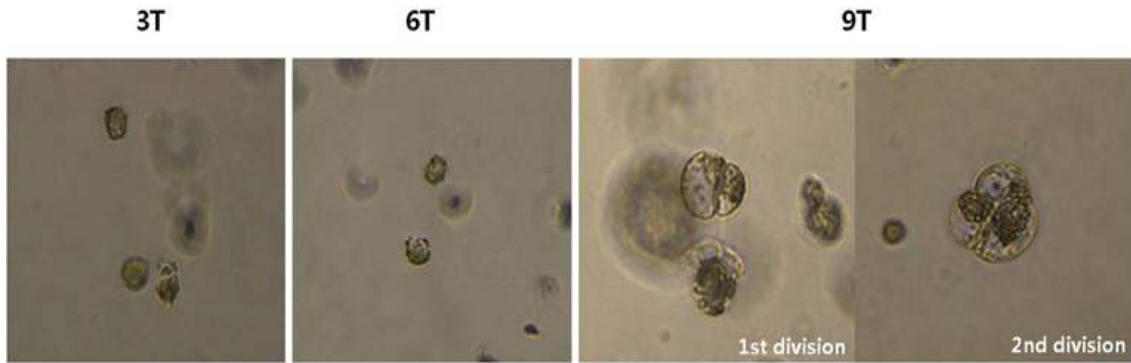


그림 5-13. Trehalose 첨가 농도에 따른 유채 원형질체의 분열 모습. 3T: 3% trehalose; 6T: 6% trehalose; 9T: 9% trehalose.

Osmoticum의 종류에 따른 최적 분열 조건을 규명하기 위해 상기 결과를 토대로 trehalose의 농도는 9%로 설정하고 9% mannitol, 6% myo-inositol 등 총 3 종류의 삼투조절제를 배지에 첨가하고 유채 원형질체의 배양 밀도를 5×10^4 개/ml, 1×10^5 개/ml, 2×10^5 개/ml 등 세가지로 구분해 각 조건 배지에 배양하였다. 약 2~3주 정도 배양하면서 각 처리구별로 세포의 분열 모습을 관찰하고(그림 5-14) 분열한 세포 수를 계수하여 배양 밀도에 따른 유채 원형질체 세포의 분열 효율을 조사하였다.

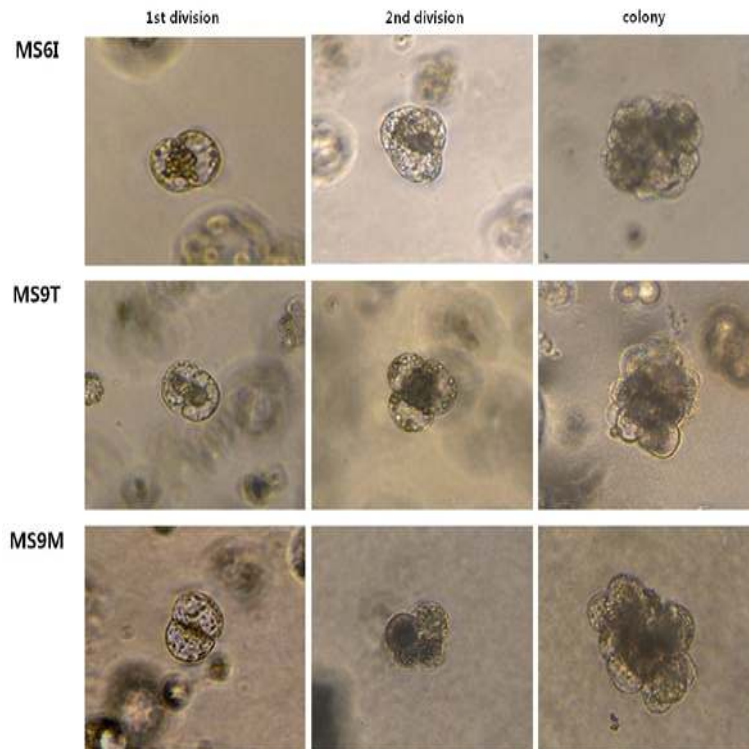


그림 5-14. Osmoticum 종류에 따른 유채 원형질체의 분열 모습.

유채 원형질체는 세 처리구에서 모두 초기 분열 단계를 거쳐 콜로니를 형성하였다. 분열 효율 조사 결과 유채 원형질체의 분열 효율은 9% trehalose 처리구에서 5×10^4 개/ml, 1×10^5 개/ml, 2×10^5 개/ml 순서로 각각 9.1, 14.8, 24.3%로 나타나 5×10^4 개/ml를 제외하고는 가장 높았고 다음으로 6% myo-inositol 처리구가 9.6, 12.8, 20.1%로 높았다. 9% mannitol 처리구의 경우에는 6.3, 8.5, 13.1%로 세 처리구 중 가장 낮았다(그림 5-15). 결과적으로 trehalose가 현재 배양 시 사용하고 있는 myo-inositol과 분열 효율이 비슷하거나 오히려 4% 정도 높게 나타나 기존 삼투조절제와 더불어 세포 배양에 사용할 수 있는 긍정적인 가능성을 확인하였다. 이것은 양배추 원형질체를 이용해 동일한 조건으로 실험했을 때에도 일치하는 결과를 얻었다(데이터 미제시). 현재 융합 조건에 사용하는 원형질체의 분리 밀도가 2×10^5 개/ml인 것을 고려하면 배지에 9% trehalose를 첨가해 배양하는 것이 분열 효율을 높이는 데 도움이 될 것으로 사료된다. 다만 trehalose가 융합 세포의 배양에도 동일한 결과를 나타낼 지 여부와 형성된 콜로니가 callus 단계를 거쳐 최종 재분화되어 식물체 과정까지 도달할 수 있을지는 확인하지 못하였기 때문에 그 효과를 단정하기는 어렵다. 향후 추가 연구를 통해 이러한 문제점을 규명하는 것도 필요할 것으로 사료된다.

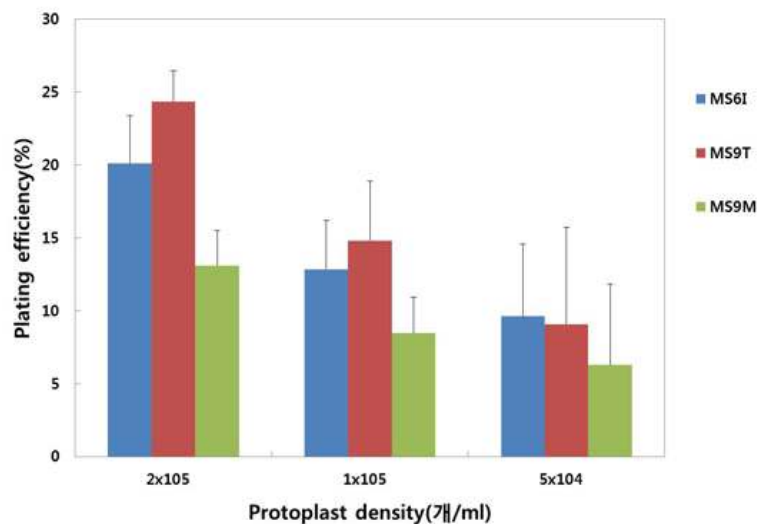


그림 5-15. Osmoticum의 종류에 따른 유채 원형질체 세포 분열 효율에 미치는 영향.

또한 유채의 경우 genotype에 따라 재분화율에 차이가 많으므로 현재 융합 재료로 사용하고 있는 월동 춘채 BN-5 외에 생명력이 강해 육종에 활용하기 좋은 새로운 품종을 융합 재료로서 추가로 확보하기 위해 제 1세부 연구팀에서 신규 유채 품종 BN 10, BN 11 2종을 분양받아

발아 및 원형질체 분리, 재생 조건 등을 탐색하였다.

우선 유채 종자의 기내배양을 위하여 1% 락스 용액으로 20분간 표면살균후 소독된 종자를 MS 기본배지에 발아시켜 발아율과 오염율을 조사하였다. 두 종의 발아율은 BN 10이 60%, BN 11이 83% 정도로 나타났고 두 종 모두 오염된 종자는 없었다(표 5-2).

표 5-2. 신규 유채 품종의 발아 및 오염율 조사

작물명	계통명	발아율(%)	오염율(%)
유채	ADBN-10	60	0
유채	ADBN-11	83	0

그러나 실제 원형질체 분리를 위해 종자 개수를 늘려 과종했을 때는 두 종 모두 오염이 발생하는 것을 관찰하였고 특히 BN 10의 경우가 심하였다. 따라서 소량의 종자를 여러 plate에 나누어 과종하고 발아 후 오염되지 않은 종자만 선별하여 이식하여 배양하는 방식을 적용하였다(그림 5-16).

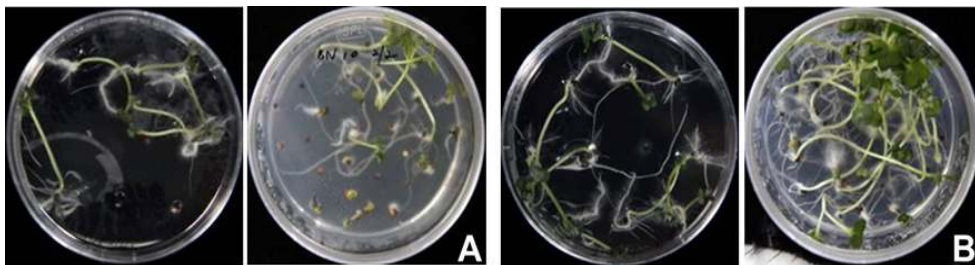


그림 5-16. 신규 유채 품종(BN 10, 11)의 발아 모습.

유채 자엽으로부터 원형질체 유리 조건을 확립하기 위하여 약 5~7일 정도 무균 발아된 2종의 유채 식물체의 자엽 약 1 g을 수거하여 CPW 13M 용액에 30분 정도 처리한 다음 세포벽 분해효소용액을 넣고 25℃ 암실에서 약 30 rpm으로 진탕하면서 16시간 정도 배양하였다. 유리된 원형질체를 CPW 9M 용액으로 2~3회 세척 후 분리된 원형질체를 회수하여 분리 밀도를 조사하고 $1\sim 2 \times 10^5$ ml/개로 조정 후 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가된 MS 6I 배지에 배양하였더니 2 종 모두 약 1주 정도에 초기 분열을 거쳐 2차 세포분열이 관찰되었다. 그러나 BN 10은 더 이상 분열하지 못하고 대부분 사멸하였고 BN 11라인만이 약 3~4주 배양 후 cell colony를 형성하면서 지속적인 증식이 이루어짐을 관찰할 수 있었다. 따라서 발아 및 오염

조건, 원형질체 분리 및 재생 효율을 고려할 때 융합 재료로서는 BN 11이 적합할 것으로 판단하고 향후 실험은 BN 11로 진행하였다(그림 5-17).

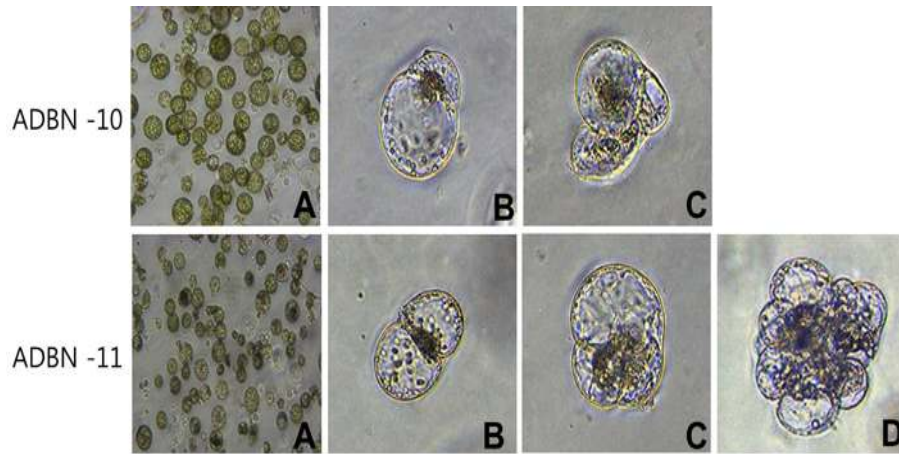


그림 5-17. 신규 유채 품종의 원형질체 분리 및 재생 체계. A: Freshly isolated protoplast; B: The first cell division of fusion cell; C: The second cell division; D: Cell colony formation.

초기 분열 단계를 거친 BN 11 원형질체의 분열 효율을 조사한 결과 5×10^4 개/ml, 1×10^5 개/ml, 2×10^5 개/ml 순서로 각각 6.1, 11.6, 22.0%로 나타나 배양 밀도가 높을수록 분열 효율은 증가하는 것으로 나타났다(그림 5-18). BN 11의 분열 효율은 현재 사용하고 있는 BN 5와 비슷하였고 callus 단계까지의 재생 능력도 양호한 것으로 나타나 융합 재료로 사용할 수 있을 것으로 판단하였다.

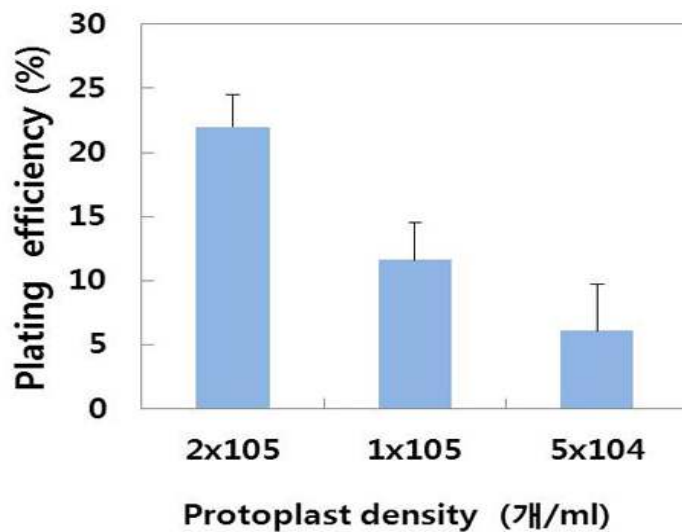


그림 5-18. 배양 밀도에 따른 유채(BN 11) 원형질체 세포 분열 효율.

형성된 유채 콜로니를 삼투조절제를 제외한 동일 조성의 배지로 옮겨 주었더니 micro callus 를 형성하였고 계속 분열 증식하면서 다수의 callus를 형성하였다. 이를 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS, 0.8% agar 배지를 기본으로 BA 2 mg/L와 NAA 0.5 mg/L 첨가 배지, zeatin을 0.2 mg/L 첨가한 MS B5 배지 등에 나누어 배양하면서 신초를 유도하였다. 그 중 zeatin이 첨가된 재분화 조건 배지에 치상된 일부 callus에서 미세한 보라색의 점들이 대량 형성되면서 신초로 분화될 가능성을 보였다(그림 5-19).

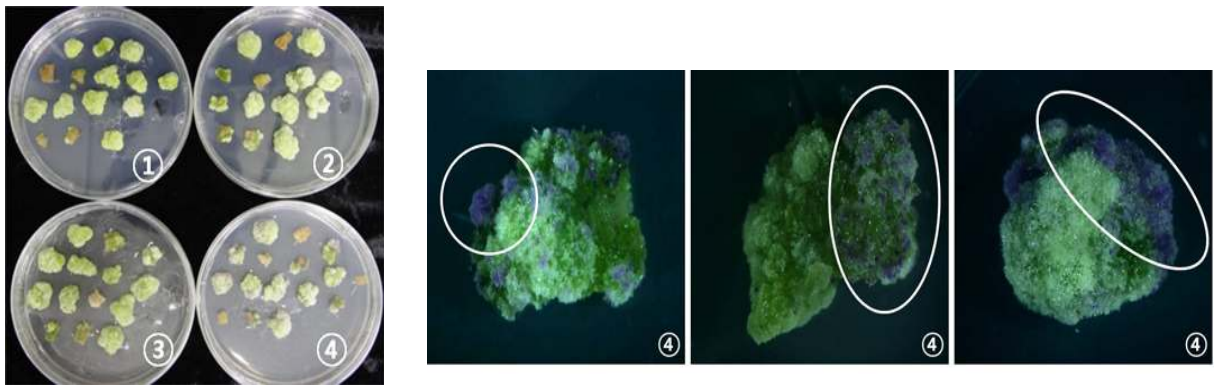


그림 5-19. 무와 유채 융합 원형질체 유래 cybrid callus 재분화 유도. ①②: MS + 1 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA; ③: MS + 2 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA; ④: MS B5 + 0.2 mg/l zeatin.

상기 조건 규명을 통해 신규 유채 품종의 원형질체 세포의 재생 체계를 확립하였다(그림 5-20).

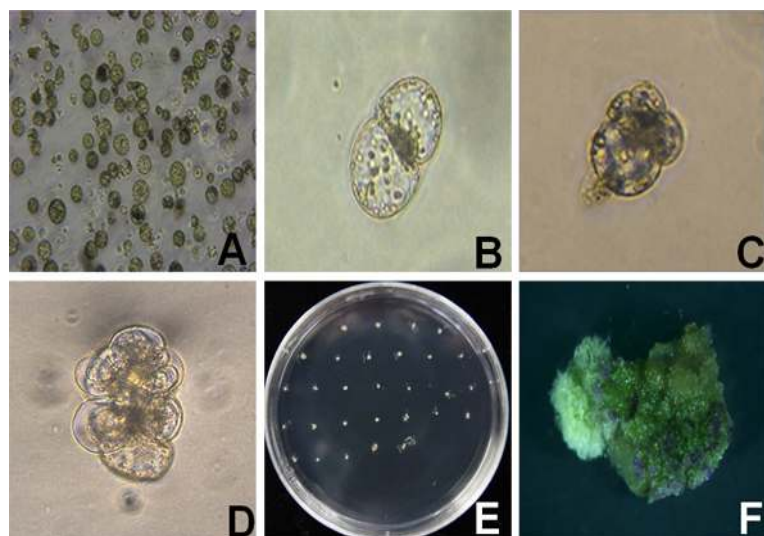


그림 5-20. 유채(BN 11) 원형질체 세포 재생 체계 확립. A: Freshly isolated protoplastthe;

B: The first cell division of fusion cell; C: The second cell division; D: Cell colony formation; E: Microcalli formation; E: Shoot induction from green callus.

상기 규명된 신규 유채 품종의 분열 및 재생 조건을 토대로 본격적으로 융합 조건을 규명하고자 기 확립된 유채 원형질체 융합 체계를 이용하여 무 원형질체와 융합을 시행하였다. 우선 품종별 특이성을 고려하여 융합 효율에 주요한 영향을 미치는 세포질 불활성화 조건을 탐색하였다(표 5-3). Iodoacetic acid (IOA) 처리 결과 0, 1 mM, 3 mM, 5 mM 3분, 5분 처리구에서는 유채 원형질체가 정상적으로 분열하는 것이 관찰되었고 5 mM 10분 이상, 10 mM 전체 처리구에서는 모두 분열을 못하고 찌그러지거나 사멸하였다. 따라서 유채 원형질체의 세포질 불활성화를 위한 최적 IOA의 농도는 5mM 이상, 처리 시간은 6분 이상 10분 이내로 하는 것이 세포의 손상을 최소화하고 융합 효율을 높일 수 있을 것으로 판단하였다.

표 5-3. 유채(BN 11) 원형질체 세포질 불활성화 조건

구분	유채 (BN 11)			
	IOA 농도(mM)			
처리시간(분)	1	3	5	10
0	+	+	+	-
3	+	+	+	-
5	+	+	+	-
10	+	+	-	-

이후 전기 융합 과정은 기 확립된 무와 유채 원형질체 융합 체계를 이용하여 실시하였다(그림 5-21).

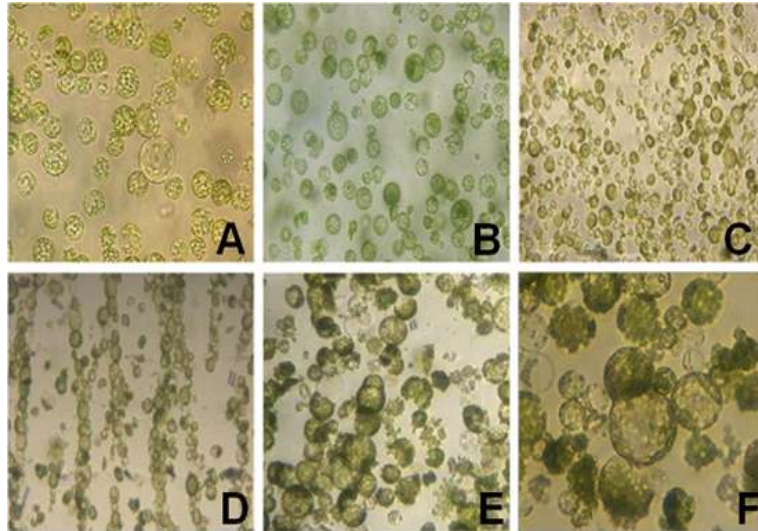


그림 5-21. 전기적 융합을 이용한 무와 유채의 원형질체 융합 체계. A: 감마선 처리한 무 원형질체; B: IOA 처리한 유채 원형질체; C: 융합전 무-유채 원형질체; D: 교류 전류에서 원형질체 사슬 형성; E-F: 직류 전류에서 원형질체의 융합.

융합된 원형질체는 6% myo-inositol, 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L이 첨가된 NH_4NO_3 free MS 배지에 희석 후 배양 세포가 cell colony를 형성할 때까지 25°C에서 약 3~4주 정도 암배양 하였다. 정상적으로 무와 유채가 융합된 세포는 배양 후 약 1주일 이내에 초기 분열을 거쳐 콜로니 단계로 분열하였고 형성된 미세 callus를 삼투조절제를 제외한 2,4-D 2 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가한 MS 배지에 옮겨 배양하였더니 약 4~6주 정도 후에는 micro calli를 형성하는 것을 관찰하였다. 이를 동일 MS 고체 배지에 옮겨 callus의 증식을 유도하였고 유도된 callus는 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS, 0.8% agar 배지를 기본으로 여러 조성의 재분화 배지로 옮겨주어 싹초를 유도하였다(그림 5-22).

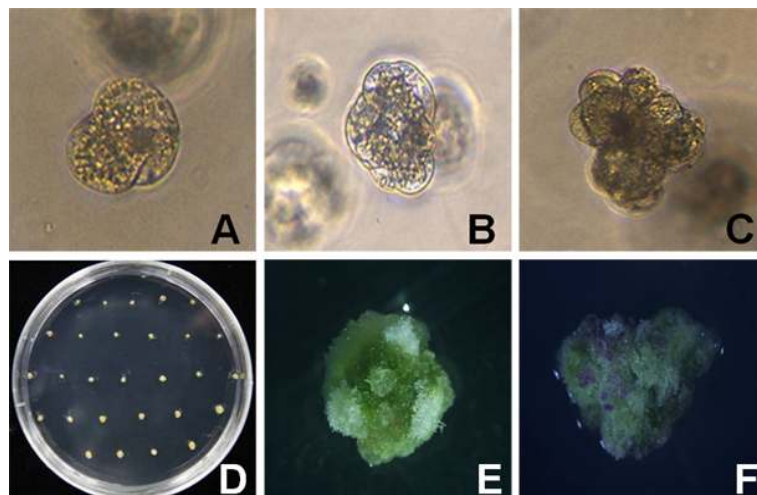


그림 5-22. 무와 유채(BN 11) 융합 원형질체 재생 체계. A: The first cell division of fusion cell; B: The second cell division; C: Cell colony formation; D: Micro calli formation; E: Callus formation; G: Shoot induction from green callus.

무와 유채 원형질체의 융합 빈도를 높이고 원형질체 배양에 요구되는 제반 배양환경 요인들을 변화시킨 결과 비교적 많은 수의 무와 유채의 융합 callus를 확보하였고 분자 마커 분석 결과 cybrid callus 선별 확률이 약 30% 정도로 높게 나타나 전년도에 비해 융합 및 재생 효율이 크게 증가했음을 확인하였다(그림 5-23). 현재까지 무의 세포질과 유채의 핵을 가진 cybrid callus로 검증된 라인은 총 8개로서 BA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS, 0.8% agar 배지를 기본으로 그 외 BA 2 mg/L와 NAA 0.5mg/L 첨가 배지, MS B5 배지에 zeatin을 0.2mg/L 첨가한 배지 등으로 나누어 배양하면서 신초를 유도하였다.

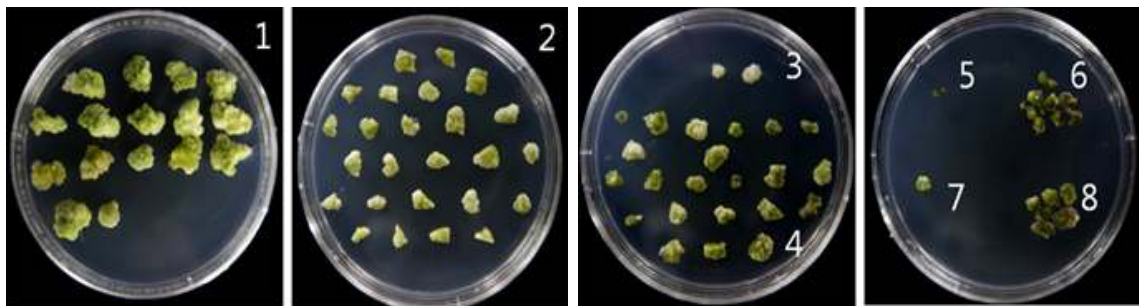


그림 5-23. 무와 유채 융합 원형질체 유래 cybrid callus 보유 현황.

무와 유채의 원형질체 융합 세부 조건들을 규명하면서 반복실험을 통해 무와 유채의 융합 callus 확보를 집중한 결과 다수의 무와 유채의 융합 callus를 확보하였고, 마커 검증을 통한 cybrid callus 선별 확률도 높여 융합 및 배양 효율이 뚜렷하게 증가했음을 확인할 수 있었다. 유채의 경우 형성된 callus로부터 신초로 재분화하는 과정에서 발달이 중단되었던 점을 고려하여 많은 선행 연구 결과들을 탐색하여 유채 재분화 배지 조성을 30 여 가지 정도로 조합하여 융합 유래 callus들을 배양하고 신초 분화를 유도하면서 관찰하였다(결과 미제시). 그 결과 BA 5mg/L와 kinetin 0.5mg/L가 첨가된 MS 배지에 3% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 고체 배지에서 효과적으로 신초가 유도된 것을 관찰하였다. 일정 크기로 성장한 신초를 성장조절제를 제외한 half MS 기본 배지로 옮겨 뿌리를 유도하였으나 뿌리가 유도되지 않았고 온전한 식물체로는 발달하지 못하였다(그림 5-24).

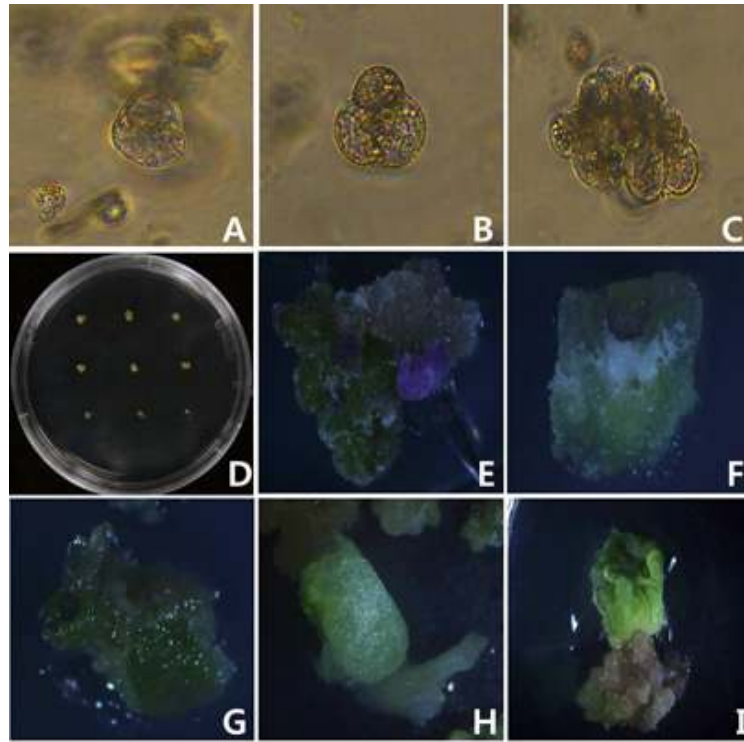


그림 5-24. 무와 유채 원형질체 융합 및 재생체계 확립. A: the first cell division of fusion cell; B: the second cell division of fusion; C: cell colony formation; D: micro callus formation; E: callus formation; F-I: shoot induction from green callus.

상기 배양 조건에서 신초가 효과적으로 유기된 것을 관찰하고 유채 cybrid 식물체 생산이 충분한 가능성이 있음을 확인하였다. 따라서 마커 검증을 통해 cybrid로 식별된 line으로부터 형성된 callus를 직접 재분화 시킴으로써 보다 신속하고 정확하게 목적 식물체를 획득하기 위하여 다양한 배지 조건에 cybrid callus를 배양하였더니 이전 결과와 마찬가지로 MS 배지에 BA 5 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L, 3% sucrose, 0.8% agar가 첨가된 배지 조성에서 신초가 유도되었고, 발달이 이루어진 신초를 성장조절제를 제외한 1/2 MS 기본 배지에 옮겨 약 3주 정도 더 배양 하였더니 뿌리가 발생되면서 정상적인 식물체로 발달되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 5-25). 향후 융합과 재생 과정을 반복 수행하면서 재현성 있는 결과가 나타나는지 좀 더 관찰이 필요할 것으로 사료된다. 만일 안정적으로 결과가 재현된다면 유채 cybrid 식물체의 효율적인 생산 체계를 확립하고 생산된 식물체를 상업적 자원으로 활용할 수 있는 가능성이 높을 것으로 기대된다.

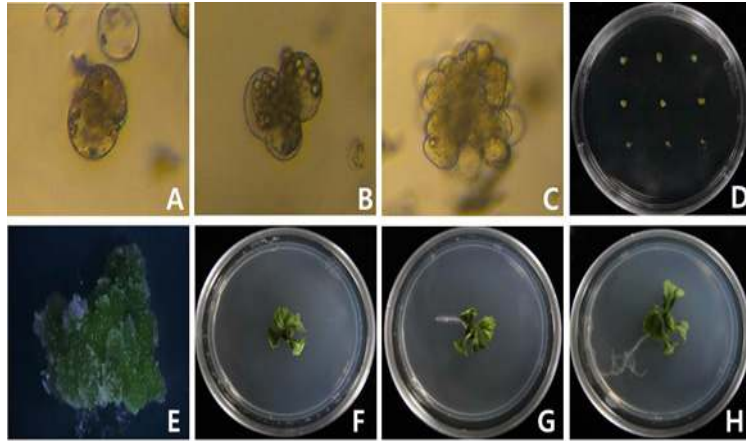


그림 5-25. 무와 유채 융합 원형질체 유래 cybrid 식물체 융합 및 재생 체계. A: The first cell division of fusion cell; B: The second cell division; C: Cell colony formation; D: Microcalli formation; E: Callus formation; F: Shoot induction from green callus; G-H: Root formation and development.

제 6 절. FT-IR 분광분석을 통한 hybrid, cybrid 식물체 판별 기술 개발

원형질체 융합을 통해 생산되어진 cybrid line 중 상당히 많은 개체들이 실제적으로는 목적하는 세포질 융합이 되지 않은 경우가 많기 때문에 대량 생산되는 cybrid callus의 원형질체 융합 여부를 조기에 판별해서 선별된 것들을 집중 관리할 수 있는 검증 시스템이 생산 효율을 높이는데 무엇보다 중요하다. 따라서 원형질체 융합을 통해 증식이 이루어진 다수의 융합 callus로부터 cybrid 후보 callus를 조기에 선별하기 위한 시스템을 DNA 분광분석을 통해 확립하였다. 현재까지는 제 1세부 연구팀에서 개발한 분자마커를 이용한 cybrid 식물체 세포질 식별 시스템을 사용하고 있는데 이는 gene specific marker를 이용하여 대량 cybrid 식물체를 1차적으로 간단하게 선별할 수 있는 시스템으로 구성되어 있다. 그러나 분자마커의 분석의 경우 일부 유전자 단편만을 확인 하는 것이기 때문에 재조합이 빈번히 일어난 callus의 전체적인 분석에는 한계가 있을 것으로 판단되었다. 따라서 제 1협동 연구팀에서는 cybrid callus의 DNA로부터 FT-IR 분석법을 통해 cybrid callus 식별 체계를 확립하였다. 이 시스템은 분자마커 시스템과 병행해 사용하면 매우 효과적으로 cybrid line을 선별 관리하는데 도움이 될 것으로 사료된다. 또한 경우에 따라서는 분자마커 시스템을 대체할 수 있는 효과적인 방법으로도 활용 될 수 있다고 판단되었다.

1. Genomic DNA 적외선 분광분석을 통한 비대칭융합 cybrid 식별 체계 확립

대사체 분석기술은 시료의 전세포추출물로부터 다양한 다변량 통계분석 기법(principal component analysis, discriminant analysis)을 이용하여 대사체 수준에서 시료간의 양적, 질적 패턴 차이를 조사하는 연구 분야로 분석 장비는 주로 FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy), HNMR (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy) 및 MS (mass spectrometry) 등이 사용되고 있다 (Krishnan et al., 2005). 특히 Fourier 변환 적외선 분광분석법(FT-IR)은 물질의 분자 진동에 의한 에너지 변화를 측정하여 대사산물의 정성·정량 분석에 이용하는 기술로서 감수도가 높고 비파괴적이며 다수의 시료에 적용하기 쉽고 간편하게 스펙트럼을 조사할 수 있다. 이와 같은 장점으로 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석 기술은 유연관계가 높은 미생물종의 식별 (Goodacre et al., 1998; Timmins et al., 1998; Wenning et al., 2002), 식물세포벽 돌연변이주 선별 (Stewart et al., 1997; Chen et al., 1998), 고등식물의 종 구분 (Kim et al., 2004) 및 품종 식별 (Kim et al., 2007; 2009)에 활용이 가능하다. 본 연구에서는 융합에 사용한 무와 양배추 두 식물체와 두 식물의 융합을 통해 생성된 callus 중

분자 마커 분석을 통해 cybrid로 검증된 callus의 genomic DNA를 추출해 FT-IR 기기로 분석 후 스펙트럼 데이터를 이용하여 cybrid를 판별할 수 있는 가능성을 탐색하고자 하였다.

무(*R. sativus*) 와 양배추(*B. oleracea* var. *capitata*) 식물체의 잎으로부터 그리고 이들의 원형질체 비대칭 융합을 통해 생산된 cybrid callus로부터 genomic DNA를 추출하였다. 식물체의 잎 및 callus를 액체질소에 급속냉동한 다음 액체질소를 첨가하면서 막자사발과 막자를 이용하여 마쇄하였다. 곱게 마쇄된 가루를 Eppendorf tube (1.5 ml)로 옮긴 다음 -70°C 에 냉동 보존한 다음 동결건조 하였다. 동결건조 된 파우더 약 10 mg 으로부터 G-spin genomic DNA 추출 kit (iNtRON biotechnology Inc, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA 는 최종적으로 TE 버퍼에 보관하였다. Genomic DNA 정량분석은 280, 260, and 230 nm 에 흡광도 분석 (NanoDrop 2000 spectrophotometer) 을 통해 검증하였다. 각 시료의 DNA 순도 검증을 위해 absorbance ratios (OD 260/OD 280) 를 각각 (Sambrook et al 1989). 적외선 분광분석에 앞서 genomic DNA 의 최종농도는 TE 버퍼를 이용하여 모두 약 $40\text{ ng}/\mu\text{l}$ 로 조정하였다. 준비된 genomic DNA 시료의 정량과 정성분석은 agarose gel 전기영동을 통해 최종 검증하였다. 준비된 genomic DNA 시료는 적외선분광분석이 이루어지기 전까지 -20°C 에서 냉동보존하였다.

FT-IR (Fourier transform infrared) 스펙트럼 조사는 Tensor 27 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany)을 사용하였고, DTGS (deuterated triglycine sulfate) 검출기로 분석하였다. 추출된 각각의 시료 $5\mu\text{L}$ 를 384-well ZnSe plate에 분주하여, 37°C hot plate에서 약 20분간 건조하였다. 건조된 ZnSe plate는 Tensor 27에 장착된 HTS-XT (Bruker Optics GmbH) 고효율 자동화 장치를 이용하여 스펙트럼을 조사하였다. 각 시료의 스펙트럼은 총 $4,000 \sim 400\text{cm}^{-1}$ 범위에서 그리고 4cm^{-1} 간격으로 총 128회 반복 측정된 평균 스펙트럼을 분석에 사용되었다. 각 시료의 FT-IR 스펙트럼은 통계적 분석을 위해 각각 3반복 측정하였다. FT-IR 스펙트럼 조사 및 데이터 변환에 사용된 프로그램은 Bruker에서 제공하는 OPUS Lab (ver. 7.0, Bruker Optics Inc.)를 사용하였다. FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석을 위해 먼저 FT-IR 스펙트럼 데이터의 baseline 교정, normalization 및 mean centering 등 스펙트럼의 전처리 과정을 R 프로그램 (version 2.15.0)을 이용하여 수행하였다. Baseline 교정을 위해 FT-IR 스펙트럼 분석 영역의 양 끝점($1,800\text{--}800\text{cm}^{-1}$)의 흡광도를 0으로 조정하였으며 실험상의 오차를 최소화하기 위하여 각 스펙트럼을 동일 면적으로 normalization 하였다. 이후 데이터의 mean centering 과정을 거쳐 2차 미분을 수행한 다음 전처리가 완료된 스펙트럼 데이터를 다변량 통계분석 분석을 위한 표준화된 데이터로 사용하였다.

다변량통계분석은 가공된 적외선분광 스펙트럼 데이터 ($1,800$ to 800 cm^{-1})를 사용하였으며 NIPALS 알고리즘(Wold, 1966)을 이용하여 R 프로그램(version 2.15.0)에서 PCA(Principal component analysis)와 PLS-DA(Partial least square discriminant analysis)분석을 수행하였다. PCA 성분 추출은 아이겐벨류(eigenvalues)가 1 이상을 기준으로 총 10개를 추출하였으며 추출된 각 PCA 성분들은 상관분석을 수행하기 위한 데이터로 사용하였다. 또한 PCA 성분 추출에 중요한 역할을 하는 스펙트럼 부위를 알아보기 위해 PCA loadings을 조사하였으며 PLS-DA 분석을 실시하였다.

무(세포질 DNA 공여체)와 양배추(핵DNA 공여체)의 비대칭 원형질체 융합을 통하여 만들어진 세포질 융합체(cybrid)로부터 추출된 genomic DNA의 적외선분광 스펙트럼 분석을 통한 cybrid 식물체 식별체계를 확립하였다(그림 6-1). 무와 양배추 그리고 원형질체 융합을 통하여 만들어진 cybrid 식물체 앞에서 추출된 genomic DNA는 적외선분광 스펙트럼상에서 특히 세 부위 즉 $1,750-1,600\text{ cm}^{-1}$, $1,550-1,200\text{ cm}^{-1}$ 그리고 $1,200-900\text{ cm}^{-1}$ 에서 큰 차이가 이루어짐을 알 수 있었다(그림 6-1A). 이들 적외선 분광스펙트럼 데이터의 PCA 분석 결과 매우 흥미롭게도 무 식물체의 genomic DNAs 조사 시료는 PCA score plot 상에서 좌측상단에 위치하며 양배추 genomic DNAs 조사 시료는 우측 하단에 주로 분포하여 무와 양배추 즉 종 수준에서 식별이 가능함을 알 수 있었다(그림 6-1B). 무와 양배추의 원형질체 융합을 통해 얻어진 cybrid중에서 분자표지를 통해 검증한 결과 cybrid가 아닌 것으로 판정된 시료들에서 추출된 genomic DNAs 조사 시료들은 양배추의 분포 범위를 포함하여 우측하단에 넓게 분포하였으며 cybrid로 판정된 시료들은 좌측 하단에서부터 우측 하단부까지 폭 넓게 분포함을 알 수 있었다(그림 6-1B). Cybrid와 non-cybrid 시료들의 경우 핵DNA 공여체인 양배추를 포함하여 일부 시료들의 중첩이 관찰되었다. 이 결과는 이들 시료의 적외선 분광스펙트럼 패턴이 매우 유사함을 나타내는 결과라 사료된다. PCA loading values를 조사한 결과 PCA 분석에서 그룹 식별에 크게 관여하는 적외선분광 스펙트럼 부위는 적외선 분광스펙트럼 비교에서 관찰한 것처럼 $1,750-1,600\text{ cm}^{-1}$, $1,550-1,200\text{ cm}^{-1}$ 그리고 $1,200-900\text{ cm}^{-1}$ 에서 흡광도 패턴 차이가 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다(그림 6-1C). PLS-DA 분석의 경우 PCA 분석보다 더욱 분명하게 무(세포질 DNA 공여체)와 양배추(핵DNA 공여체) 그리고 세포질 융합체(cybrid) 사이의 식별이 가능함을 보여주고 있다(그림 6-1D). 이상의 결과로 미루어볼 때 cybrid 식물체의 genomic DNA 시료 적외선분광분석은 cybrid 식물체 조기 식별 수단으로 활용이 가능하며 아울러 분자표지를 이용한 식별을 대체할 수 있는 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

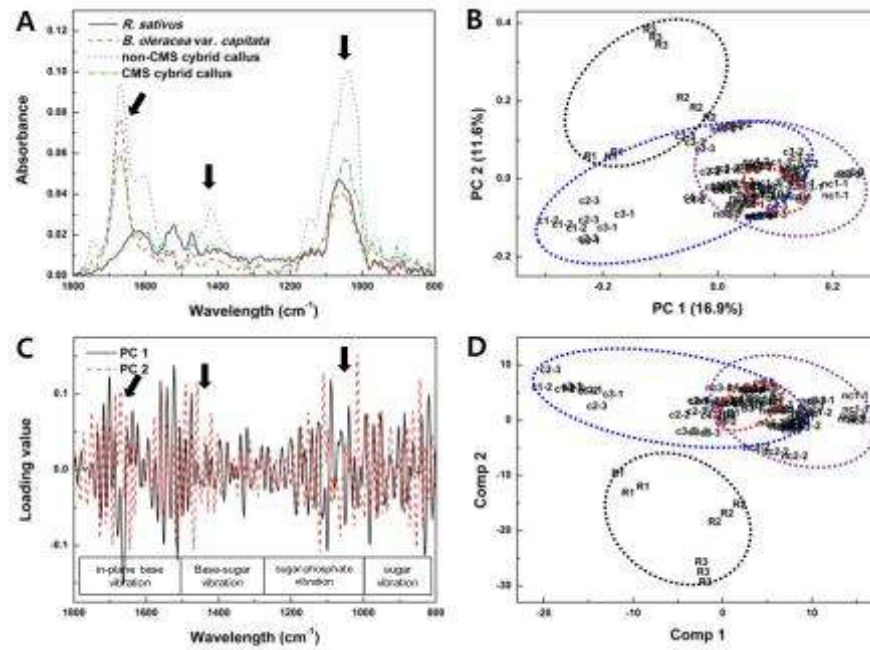


그림 6-1. Confirmation of CMS cybridization from proroplast-derived calluses. Capitals and numbers represent parental line and their putative cybrid calluses. S: size marker; R: *R. sativus*; B: *B. oleracea* var. *capitata*; 1-7: Putative cybrid callus lines. Figure 3. Multivariate analysis from FT-IR spectral data. A: Representative FT-IR spectra of each line. B: PCA score plot of FT-IR spectral data. C: Loading values of PC 1 and PC 2. D: PLS-DA score plot of FT-IR spectral data. Arrows indicate FT-IR spectra variables which showing significant variation between parental and their cybrid callus (A, C). Circles represent boundary for group discrimination (B, D). Capitals and numbers represent sample name and replicates, respectively. R: *R. sativus*; B: *B. oleracea* var. *capitata*; c: CMS cybrid callus lines; nc: non-cybrid callus lines.

무(세포질 DNA 공여체)와 양배추(핵 DNA 공여체) 그리고 비대칭 원형질체 융합을 통하여 만들어진 세포질 융합체(cybrid)로부터 추출된 genomi DNA 시료의 적외선 분광 스펙트럼 데이터로부터 융합체의 식별이 가능한지 여부를 조사하였다 (표 6-1). 무 (*R. sativus*)의 3개 적외선 분광 스펙트럼을 PLS-DA 분류 기법을 이용하여 집단 예측을 수행한 결과 3개 스펙트럼 모두 무 집단에 구분이 됨을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 양배추 유래 스펙트럼 모두 양배추 집단에 정확하게 예측되며 구분이 가능함을 확인하였다. 무와 양배추의 원형질체 융합을 통해 얻어진 융합체이지만 무의 세포질 유전자가 도입되지 않은 비-세포질 융합체 callus 라인에서 얻어진 스펙트럼 9개를 집단 예측을 수행한 결과 9개 스펙트럼 모두 비-세포질 융합체 callus 라인으로 집단 예측 및 구분이 이루어짐을 확인할 수 있었다. CMS 세포질 융합체 (cybrid)

callus 라인의 경우 9개의 스펙트럼 데이터를 집단예측에 사용하였으나 9개중 7개는 CMS 세포질 융합체로 예측 구분이 가능하였으나 나머지 2개 스펙트럼은 비-세포질 융합체 callus 라인으로 집단 예측이 이루어짐을 알 수 있었다. 이상의 결과를 요약해보면 총 24개의 적외선분광 스펙트럼데이터를 예측한 결과 22개는 정확하게 집단 예측 및 구분이 가능하였으나 2개는 유사성이 가장 높은 집단으로 잘못 예측이 이루어짐을 알 수 있었다. 즉 적외선분광 스펙트럼 데이터를 이용하여 4개의 분류집단 (무, 양배추, CMS 세포질 융합체 (cybrid) callus 라인, 비-세포질 융합체 callus 라인)으로 예측 및 구분의 정확도는 약 91.7%임을 알 수 있었다. CMS 세포질 융합체 (cybrid) callus 라인과 비-세포질 융합체 callus 라인의 경우 동일한 핵DNA를 공유하는 집단이므로 이들 사이의 스펙트럼 유사도가 높아 분류예측의 오류가 발생한 것으로 추정된다. 향후 이들 집단의 시료 확보를 통한 표본의 수가 증가하게 되면 적외선 분광 스펙트럼 데이터를 이용한 집단 분류예측의 정확도가 증가할 것으로 기대된다. 아울러 본 결과는 세포질 융합체 식물체 조기 식별 수단으로 활용이 가능하며 아울러 분자표지를 이용한 식별을 대체할 수 있는 수단으로 타 작물에서도 활용이 가능할 것으로 기대된다.

표 6-1. Summary of the PLS-DA classification results from FT-IR spectral data of genomic DNA. The discriminant functions were determined using the first seven principal components determined by PCA. In bootstrapping, each case was classified by the functions derived from all other cases. R: *R. sativus*; B: *B. oleracea* var. *capitata*; c: CMS cybrid callus lines; nc: non-cybrid callus lines

		Prediction				Total	
		R	B	NC	C		
Cross validated	Count	R	3	0	0	3	
		B	0	3	0	3	
		NC	0	0	9	9	
		C	0	0	2	7	
Total			3	3	11	7	24

2. Genomic DNA 적외선 분광분석을 통한 무와 양배추 hybrid 식별 기술 개발

무(*R. sativus*) 와 양배추(*B. oleracea* var. *capitata*) 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 식물체의 잎 시료를 액체질소에 급속냉동한 다음 액체질소를 첨가하면서 막자사발과 막자를 이용하여 마쇄하였다. 곱게 마쇄된 가루를 Eppendorf tube (1.5 ml)로 옮긴 다음 -70°C 에 냉동 보존한 다음 동결건조하였다. 동결건조된 파우더 약 10 mg 으로부터 G-spin genomic DNA 추출 kit (iNtRON biotechnology Inc, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA 는 최종적으로 TE 버퍼에 보관하였다. Genomic DNA 정량분석은 280, 260, and 230 nm 에 흡광도 분석 (NanoDrop 2000 spectrophotometer) 을 통해 검증하였다. 각 시료의 DNA 순도 검증을 위해 absorbance ratios (OD 260/OD 280) 를 각각 (Sambrook et al 1989). 적외선분광분석에 앞서 genomic DNA 의 최종농도는 TE 버퍼를 이용하여 모두 약 40 ng/ μl 로 조정하였다. 준비된 genomic DNA 시료의 정량과 정성분석은 agarose gel 전기영동을 통해 최종 검증하였다. 준비된 genomic DNA 시료는 적외선분광분석이 이루어지기 전까지 -20°C 에서 냉동 보존하였다.

정제한 무와 양배추 genomic DNA는 서로다른 비율(1N9C, 2N8C, 3N7C, 4N6C, 5N5C, 6N4C, 7N3C, 8N2C, 그리고 9N1C)로 섞어서 혼합 DNA 시료를 준비하였다. 적외선 분광 스펙트럼 조사 및 다변량 통계분석은 상기의 분석 조건과 동일한 조건으로 실시하였다.

무와 양배추의 각각의 genomic DNA 및 무와 양배추 DNA의 인위적인 혼합DNA(9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9)를 FT-IR로 조사하였다. 무와 양배추 그리고 이들의 5:5 혼합 genomic DNA의 FT-IR 스펙트럼을 비교 분석한 결과 2,400-2,300, 2,100-2,000, 1,700-1,600, 그리고 1,100-900 cm^{-1} 부위에서 시료간에 스펙트럼의 양적 흡광도차이가 크게 이루어짐을 알 수 있었다(그림 6-2A). 즉 FT-IR 스펙트럼의 비료분석을 통해 무와 양배추 그리고 이들의 혼합 DNA 용액에서 이들 스펙트럼 부위의 양적인 차이가 매우 큼을 보여주고 있다. 일반적으로 핵산의 적외선 분광분석 스펙트럼은 핵산분자의 상호작용 및 구조적 변화에 의해 크게 4개 부위에서 스펙트럼의 양적 또는 질적인 변화가 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Banyay et al 2003; Gonzalez-Ruiz et al 2011). 첫 번째 적외선 흡광부위는 1,750-1,600 cm^{-1} 부위로 핵산의 염기쌍에 존재하는 C=O, C=N, C=C stretching과 NH_2 bending vibration에 의해 이루어지는 스펙트럼의 변화가 반영되는 부위이다(Brewer et al 2002; Banyay et al 2003). 두 번째 부위는 1,550-1400 cm^{-1} 부위로 purine and pyrimidine ring의 구조적 변화에 민감한 부위이다(Falk et al 1963; Liquier et al 1991; Zhou-Sun et al 1997). 나머지 스펙트럼 부위는 1,200 - 1,000 cm^{-1} 부위로 핵산 인지질 골격의 인산기의 대칭성 차이에 민감한 부위이다(Falk et al 1963; Zhou-Sun et al 1997). 따라서 시료 스펙트럼의 양적 질적 차이는 핵산 골격의 염기쌍과 당분자 그리고 인산기 사이의 구조적 변화에 민감하게 반응하는 부위들이다(Brewer et al 2002;

Gonzalez-Ruiz et al 2011). 따라서 무와 양배추 genomic DNA 사이의 FT-IR 스펙트럼 차이는 이들 식물의 핵산에 존재하는 염기쌍 및 핵산 골격의 근본적인 차이가 존재함을 나타내는 결과라 사료된다.

무와 양배추 그리고 이들의 혼합 genomic DNA 용액으로부터 얻어진 FT-IR 스펙트럼 데이터를 PCA 분석한 결과 무와 양배추 genomic DNA의 식별이 가능하였다(그림 6-2B). PC score 1은 23.4% 그리고 PC score 2는 10.6%로 PCA 분석을 통해 전체 변이량의 약 34%를 반영함을 알 수 있었다. 또한 각 시료의 반복구들이 비교적 가까운 공간에 위치하여 적외선 분광스펙트럼 분석의 재현성이 높음을 알 수 있었다. 양배추 genomic DNA는 PCA score plot의 가장 좌측하단에 위치하였으며 반대로 무 genomic DNA시료들은 우측 상단에 위치함을 알 수 있었다. 무와 양배추의 혼합 DNA용액 시료들은 거의 농도에 비례하여 PCA score plot 좌우측 하단에 그룹을 형성하며 분포함을 알 수 있었다. 그러나 무의 genomic DNA가 80% (8N2C) 그리고 90%(9N1C) 이상 혼합된 용액은 서로간에 식별이 불가능하였으며 거의 무 genomic DNA 부근에 위치함을 알 있었다. 이러한 결과는 양배추의 genomic DNA 시료에서도 마찬가지로 나타나 양배추의 genomic DNA가 80% (2N8C) 그리고 90%(1N9C) 이상 혼합된 용액의 식별은 불가능하였으며 이들 시료는 양배추의 genomic DNA 에 거의 인접하여 분포함을 알 수 있었다. 이 결과는 비록 혼합 용이지만 양배추나 무의 DNA비율이 매우 높을 경우 양배추나 무와 거의 유사한 분포를 하여 적외선 분광분석을 통해 식별이 용이하지 않음을 나타내는 결과라 사료된다. 그러나 무와 양배추의 genomic DNA가 동일 비율(5N5C) 또는 이보다 한쪽이 약간 높은 시료들(4N6C, 6N4C)시료들의 경우는 PC score 1축을 기준으로 무와 양배추의 중간에 위치함을 알 수 있었다. 이 결과로 미루어볼 때 혼합용액의 DNA 서열 이질성이 증가할 경우 적외선 분광분석을 통한 시료 식별이 가능함을 나타내는 결과라 사료된다.

무와 양배추 그리고 이들의 혼합 genomic DNA 용액의 PCA 분석 상에서 이루어지는 시료 집단 식별에 중요한 역할을 하고 있는 적외선 분광 스펙트럼 부위를 조사하였다(Fig. 62C). PC loading value는 FT-IR스펙트럼의 비교분석에서 보여주었던 중요 차이를 나타내는 부위들과 마찬가지로 이들 부위가 시료의 집단 식별에 중요함을 알 수 있었다. 즉 FT-IR 스펙트럼의 2,400-2,300, 2,100-2,000, 1,700-1,600, 그리고 1,100-900 cm^{-1} 부위가 무와 양배추 그리고 이들의 혼합 시료 식별에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

무와 양배추 그리고 이들의 혼합 genomic DNA 용액으로부터 얻어진 FT-IR 스펙트럼 데이터를 PLS-DA 분석한 결과 PCA분석보다 이들 시료의 집단 구분이 더욱 분명하게 이루어짐을

알 수 있었다(그림 6-2D). 무와 양배추의 genomic DNA시료는 PLS-DA plot 상에서 좌우로 구분되어 분포하였으며, 재미있게도 무와 양배추의 DNA가 거의 절반씩 혼합된 시료들이 PLS-DA plot상에서 주로 중앙부위에 분포하였다. 또한 무나 양배추의 genomic DNA가 80% 이상 혼합된 시료들은 각각 무나 양배추 시료가 분포한 인근 지역에 주로 분포하고, 한쪽의 비율이 7:3인 시료들 즉 무:양배추 7:3 또는 3:7혼합 DNA 시료들은 가운데 5:5 시료를 기준으로 무나 양배추 쪽으로 별도의 그룹을 형성하며 분포함을 알 수 있었다. 이 결과는 genomic DNA의 FT-IR 스펙트럼을 통해 무와 양배추 그리고 이들의 DNA가 혼합된 DNA의 식별이 가능함을 보여주는 결과라 사료된다. 각 생물종은 각자의 고유한 genomic DNA 특성을 가지고 있다. 따라서 적외선 분광분석을 통한 이들의 식별은 생물종이나 이들의 hybrid 식별은 물론 더 나아가 genomic DNA상에서 이루어지는 염기쌍의 구조적 변화나 서열의 변화 등을 연구할 수 있는 새로운 단초를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

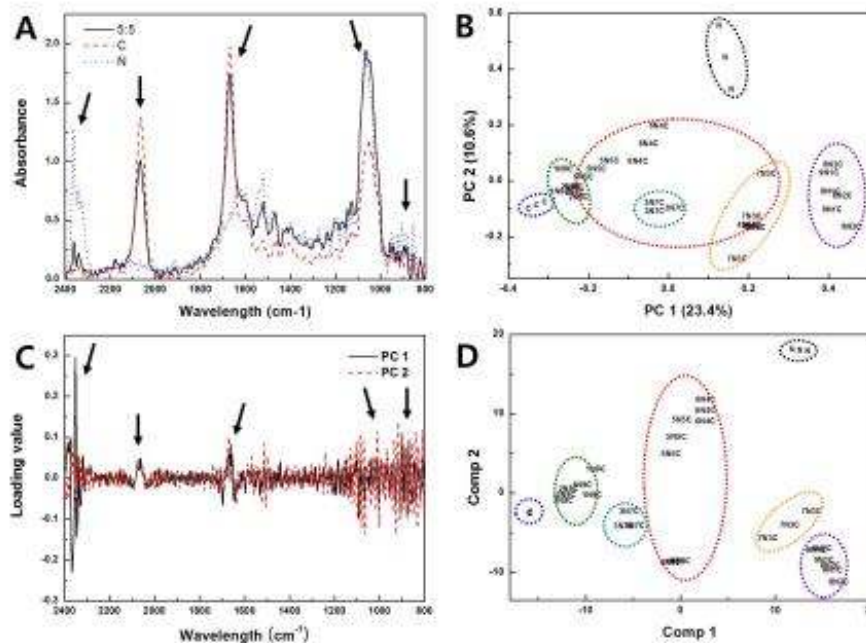


그림 6-2. FT-IR spectral analysis of genomic DNAs from *R. sativus* and *B. oleracea* var. *capitata*. A : Representative FT-IR spectra. B : PCA plot of FT-IR spectral data. C : Loading values of PCA. D: PLS-DA plot of FT-IR spectral data. Arrows represent significant spectral variations between genomic DNAs from *R. sativus* and *B. oleracea*. Dotted circles represent each DNA sample belonging to same group. Capital letters represent each DNA sample name. C: cabbage, N: *R. sativus*; xNxN: mixture of genomic DNAs in proportion to its molal ratio between *R. sativus* and *B. oleracea* (1N9C, 2N8C,

3N7C, 4N6C, 5N5C, 6N4C, 7N3C, 8N2C, and 9N1C).

3. Genomic DNA의 FT-IR 분광 분석을 통한 배추, 양배추 그리고 유채의 식별 기술 개발

배추(*B. campestris* subsp. *pekinensis*), 양배추(*B. oleracea* var. *capitata*) 그리고 유채(*B. napus*) 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 식물체의 잎 시료를 액체질소에 급속냉동한 다음 액체질소를 첨가하면서 막자사발과 막자를 이용하여 마쇄하였다. 곱게 마쇄된 가루를 Eppendorf tube (1.5 ml)로 옮긴 다음 -70°C 에 냉동 보존한 다음 동결건조 하였다. 동결건조된 파우더 약 10 mg 으로부터 G-spin genomic DNA 추출 kit (iNtRON biotechnology Inc, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 최종적으로 TE 버퍼에 보관하였다. Genomic DNA 정량분석은 280, 260, and 230 nm에 흡광도 분석 (NanoDrop 2000 spectrophotometer)을 통해 검증하였다. 각 시료의 DNA 순도 검증을 위해 absorbance ratios (OD 260/OD 280)를 각각 (Sambrook et al 1989). 적외선분광분석에 앞서 genomic DNA의 최종농도는 TE 버퍼를 이용하여 모두 약 40 ng/ μl 로 조정하였다. 준비된 genomic DNA 시료의 정량과 정성분석은 agarose gel 전기영동을 통해 최종 검증하였다. 준비된 genomic DNA 시료는 적외선분광분석이 이루어지기 전까지 -20°C 에서 냉동보존하였다.

정제한 배추와 양배추 genomic DNA는 서로 다른 비율(5:5, 7:3, 3:7)로 섞어서 혼합 DNA 시료를 준비하였다. 적외선 분광 스펙트럼 조사 및 다변량 통계분석은 상기의 분석 조건과 동일한 조건으로 실시하였다.

배추와 양배추 그리고 유채의 각각의 genomic DNA 및 배추와 양배추 DNA의 인위적인 혼합DNA(5:5, 7:3, 3:7)로부터 FT-IR 분석을 실시하였다(그림 6-3). 무와 양배추 그리고 유채 genomic DNA의 FT-IR 스펙트럼을 비교 분석한 결과 1,700-1,500, 그리고 1,100-900 cm^{-1} 부위에서 시료간에 스펙트럼의 양적 흡광도차이가 크게 이루어짐을 알 수 있었다(그림 6-3A). 즉 FT-IR 스펙트럼의 비료분석을 통해 무와 양배추 그리고 유채와 이들의 혼합 DNA 용액에서 FT-IR 스펙트럼의 양적인 차이가 매우 큼을 보여주고 있다. 일반적으로 핵산의 적외선 분광분석 스펙트럼은 핵산분자의 상호작용 및 구조적 변화에 의해 크게 4개 부위에서 스펙트럼의 양적 또는 질적인 변화가 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Banyay et al 2003; Gonzalez-Ruiz et al 2011). 첫 번째 적외선 흡광부위는 1,750-1,600 cm^{-1} 부위로 핵산의 염기 쌍에 존재하는 C=O, C=N, C=C stretching과 NH_2 bending vibration에 의해 이루어지는 스펙트럼의 변화가 반영되는 부위이다(Breweretal2002; Banyayetal2003). 두 번째 부위는 1,550-1400 cm^{-1} 부위로 purine and pyrimidine ring의 구조적 변화에 민감한 부위이다(Falk et al 1963; Liquier et al 1991; Zhou-Sun et al 1997). 나머지 스펙트럼 부위는 1,200 - 1,000 cm^{-1} 부위로

핵산 인지질 골격의 인산기의 대칭성 차이에 민감한 부위이다(Falk et al 1963; Zhou-Sun et al 1997). 따라서 시료 스펙트럼의 양적 질적 차이는 핵산 골격의 염기쌍과 당분자 그리고 인산기 사이의 구조적 변화에 민감하게 반응하는 부위들이다(Brewer et al 2002; Gonzalez-Ruiz et al 2011). 따라서 무와 양배추 그리고 유채 genomic DNA 사이의 FT-IR 스펙트럼 차이는 이들 식물의 핵산에 존재하는 염기쌍 및 핵산 골격의 근본적인 차이가 존재함을 나타내는 결과라 사료된다.

무와 양배추 그리고 유채와 이들의 혼합 genomic DNA 용액으로부터 얻어진 FT-IR 스펙트럼 데이터를 PCA 분석한 결과 무와 양배추 그리고 유채 genomic DNA의 식별이 가능하였다(그림 6-3B). PC score 1은 54.3% 그리고 PC score 2는 9.7%로 PCA 분석을 통해 전체 변이량의 약 64%를 반영함을 알 수 있었어 시료간의 식별이 잘 이루어짐을 알 수 있었다. 또한 각 시료의 반복구들이 비교적 가까운 공간에 위치하여 적외선 분광스펙트럼 분석의 재현성이 매우 높음을 알 수 있었다. 양배추 genomic DNA는 PCA score plot의 가장 좌측하단에 위치하였으며, 배추 genomic DNA는 PCA score plot의 중앙 상단에 그리고 유채 genomic DNA는 PCA score plot의 우측 중앙에 위치함을 알 수 있었다. 양배추와 배추 genomic DNA의 혼합 용액은 양배추 DNA의 혼합 농도에 따라 분포 위치가 변화되었다. 양배추와 배추 genomic DNA를 각각 5:5로 혼합한 용액은 PC 1과 PC 2 축을 기준으로 거의 양배추와 배추의 중간에 위치하였다. 양배추와 배추 genomic DNA를 각각 3:7로 혼합한 용액은 배추쪽에 인접하여 분포하였으며 양배추와 배추 genomic DNA를 각각 7:3으로 혼합한 용액 유채와 인접하여 분포하였다. 이러한 결과는 양배추와 배추의 genomic DNA가 7:3으로 혼합되었을 때 유채 genomic DNA와 FT-IR 스펙트럼 패턴이 비슷하다는 결과라 사료되며 이들의 진화적 유연관계를 규명하는 단초로 십자화과 genome 패턴 분석 연구 수단으로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

무와 양배추 그리고 유채와 이들의 혼합 genomic DNA 용액의 PCA 분석 상에서 이루어지는 시료 집단 식별에 중요한 역할을 하고 있는 적외선 분광 스펙트럼 부위를 조하였다(그림 6-3C). PC loading value는 FT-IR스펙트럼의 비교분석에서 보여주었던 중요 차이를 나타내는 부위들과 마찬가지로 이들 부위가 시료의 집단 식별에 중요함을 알 수 있었다. 즉 FT-IR 스펙트럼의 1,700-1,500, 그리고 1,100-900 cm^{-1} 부위가 무와 양배추 그리고 이들의 혼합 시료 식별에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

무와 양배추 그리고 유채 및 이들의 혼합 genomic DNA 용액으로부터 얻어진 FT-IR 스펙트럼 데이터를 PLS-DA 분석한 결과 PCA분석보다 이들 시료의 집단 구분이 더욱 분명하게 이루어짐을 알 수 있었다(그림 6-3D). 양배추 genomic DNA는 PLS-DA score plot의 가장 우측하단에 위치하였으며, 배추 genomic DNA는 PLS-DA score plot의 중앙 상단에 그리고 유채 genomic DNA는 PLS-DA score plot의 좌측 중앙에 위치함을 알 수 있었다. 양배추와 배추 genomic DNA의 혼합 용액은 PCA분석과 마찬가지로 양배추 DNA의 혼합 농도에 따라 분포 위치가 변화되었다. 양배추와 배추 genomic DNA를 각각 5:5로 혼합한 용액은 comp 1과 comp 2 축을 기준으로 거의 양배추와 배추의 우측 중간에 위치하였다. 양배추와 배추 genomic DNA를 각각 3:7로 혼합한 용액은 배추쪽에 인접하여 분포하였으며 양배추와 배추 genomic DNA를 각각 7:3으로 혼합한 용액 유채와 인접하여 분포하였다. 이 결과는 genomic DNA의 FT-IR 스펙트럼을 통해 무나 양배추 그리고 유채 및 이들의 DNA가 혼합된 DNA의 식별이 가능함을 보여주는 결과라 사료된다. 각 생물종은 각자의 고유한 genomic DNA 특성을 가지고 있다. 따라서 적외선 분광분석을 통한 이들의 식별은 생물종이나 이들의 hybrid 식별은 물론 더 나아가 genomic DNA상에서 이루어지는 염기쌍의 구조적 변화나 서열의 변화 등을 연구할 수 있는 새로운 단초를 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 생물종 genome의 진화적 측면을 연구할 수 있는 새로운 단서를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

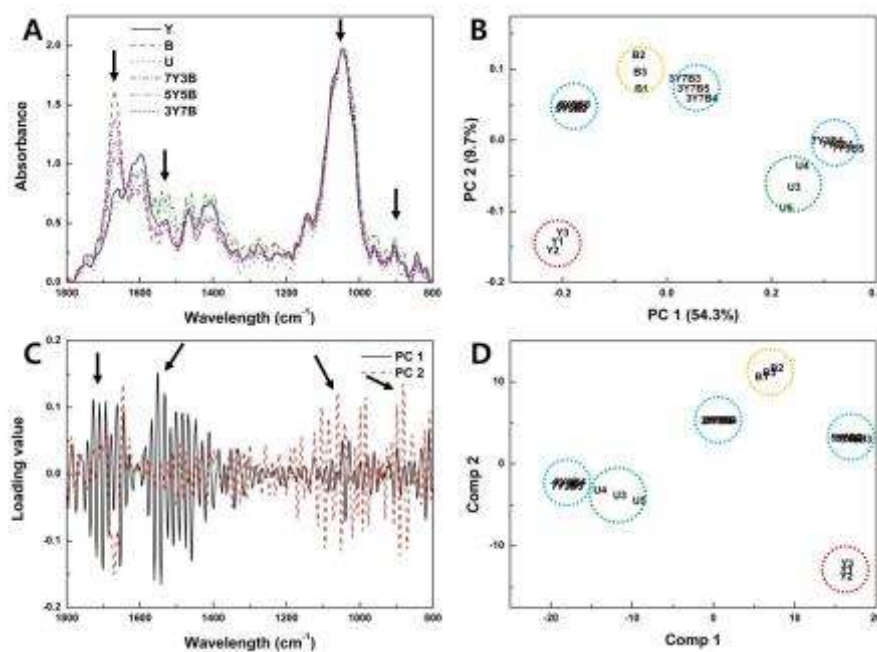


그림 6-3. FT-IR spectral analysis of genomic DNAs from *B. oleracea* var. *capitata*, *B. campestris* subsp. *pekinensis* and *B. napus*. A : Representative FT-IR spectra. B : PCA plot of FT-IR spectral data. C : Loading values of PCA. D: PLS-DA plot of FT-IR

spectral data. Arrows represent significant spectral variations between genomic DNAs from *B. oleracea* var. *capitata*, *B. campestris* subsp. *pekinensis* and *B. napus*. Dotted circles represent each DNA sample belonging to same group. Capital letters represent each DNA sample name. Y: *B. oleracea* var. *capitata*, B: *B. campestris* subsp. *pekinensis*, U: *B. napus* ; xYxB: mixture of genomic DNAs in proportion to its molal ratio between *B. oleracea* and *B. campestris* (7Y3B, 5Y5B, and 3Y7B). Numbers represent each replicate.

제 7 절. DCGMS 응성불임 후보 유전자 탐색

무에서 신규로 개발된 DCGMS의 응성불임을 일으키는 유전자는 아직 밝혀진 바가 없고, DCGMS의 응성불임성을 타 십자화과로 성공적인 전이를 위해서는 응성불임 유전자를 확인하는 것이 매우 중요한 연구이다. 기존에 알려진 응성불임 자원의 유전자는 대부분이 재조합(recombination)에 의해 새로운 ORF가 생성되고, 생성된 신규 ORF가 응성불임 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 미토콘드리아에 존재하는 short repeat sequence는 통상 100bp 이하의 크기 존재하며 recombination을 유도하여 미토콘드리아 genome의 rearrangement를 일으키는 것으로 알려졌다(Albert et al., 1998; Kim et al., 2007). 따라서 본 연구에서는 무의 short repeat sequence들을 확인하고 이를 기반으로 한 DCGMS에서만 존재하는 신규 ORF를 탐색하고자 하였다.

1. 무의 short repeat sequence 분석

통상적으로 short repeat sequence는 *atp6* 유전자 주변에 많이 분포하는 것에 착안하여 다양한 mitotype(미토콘드리아 유전형)의 무 자원에서 염기서열 분석을 통해 무의 short repeat sequence들을 확인하였다.

무의 mitotype은 기존 보고에 총 4가지로 분류 된다는 것이 확인 되었고, 각각 MBRMF1 mitotype, DBRMF2 mitotype, Ogura mitotype, DCGMS mitotype으로 명명된 바가 있다(Kim et al., 2007). DBRMF1과 DBRMF2 그리고 DCGMS에서 *atp6* 유전자 주변의 미토콘드리아 genome을 분석해 보았을 때, short repeat sequence이 확인이 되었고 rearrangement가 일어난 것을 확인 할 수 있었다(그림 7-1). 예를 들어 DBRMF2의 *atp6* 유전자 주변의 R3(short repeat sequence 3)와 DBRMF2의 *nad3-rps12* 유전자 주변의 R3가 서로 single recombination이 일어나 DCGMS의 *atp6-nad3-rps12* 유전자 구조가 생성된 것을 확인하였다(그림 7-1A). 또한 DBRMF2의 *atp6* 유전자 주변과 DBRMF2의 *nad3-rps12* 유전자 주변의 R3 부분과 R5-R6 사이 부분에서 double recombination이 일어나 DBRMF1의 *atp6* 주변 유전자 구조가 생성되었음을 확인 했다(그림 7-1B).

또한 이러한 short repeat sequence는 무의 *coxI* 유전자나 겨자(*Brassica tournefortii*)에서 유래한 응성불임 유전자인 *orf263* 유전자에서도 확인 할 수 있었다(그림 7-2). *coxI* 유전자의 경우 R3와 R4 부위 short repeat sequence를 포함하고 있었으며, *orf263* 유전자는 R2에서 R6까지의 short repeat sequence를 모두 포함하고 있었다. 흥미로운 사실은 *coxI* 유전자와 *orf263*

유전자 모두 R3 내에 있는 "ATG" sequence에 의해 start codon이 생성되었다는 점이다. 이러한 사실로 R3는 recombination이 빈번하게 일어나기도 하지만 recombination이 일어났을 때, "ATG" sequence가 포함되어 있어 신규 ORF가 생길 수 있는 확률이 높다고 판단되었다.

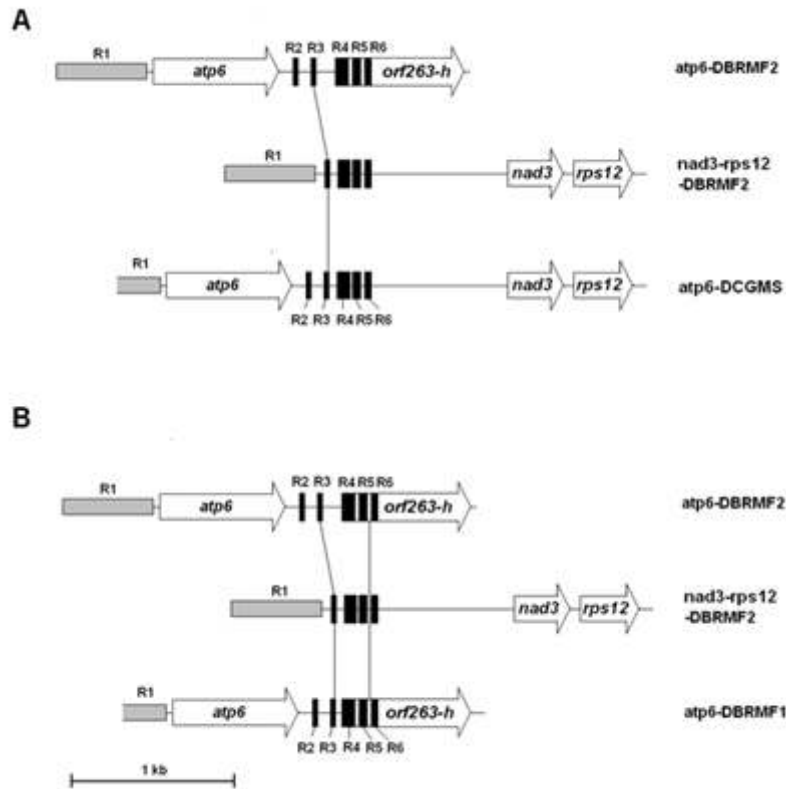
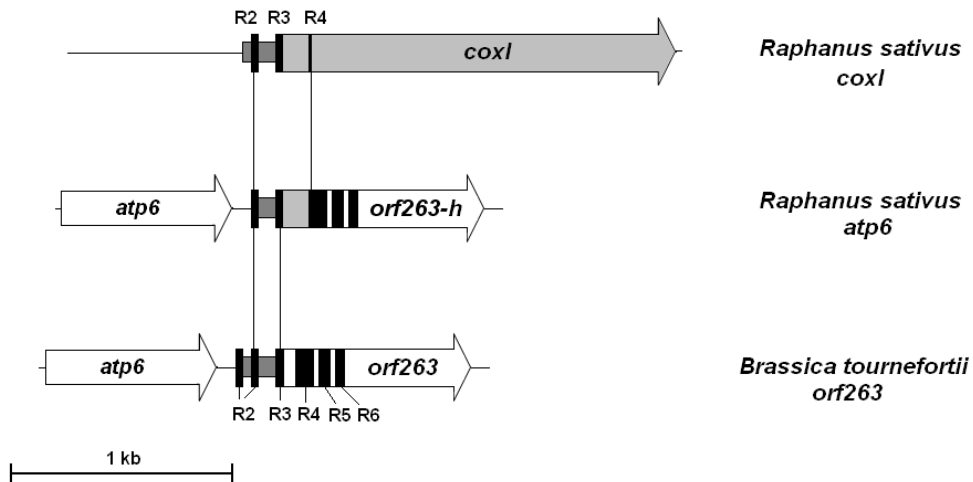


그림 7-1. 3가지 다른 mitotype(DBRMF1, DBRMF2, DCGMS)에서 *atp6* 유전자 주변의 미토콘드리아 유전체 구조 비교 분석 A; Comparison of *atp6*-flanking sequences between the DBRMF2 and DCGMS mitotypes. *orf263-h*: homologous sequence of *Brassica tournefortii orf263* gene. Arrow-shaped boxes indicate the 5'-to-3' direction. The rectangular, grey boxes(R1) indicate repeat sequences. The filled rectangular boxes (R2-R6) are short repeat sequences. B; Comparison of *atp6*-flanking sequences between the DBRMF1 and DBRMF2 mitotypes.

A



B

	R2	R2	
R. sativus atp6	<u>TTGAACAAAAGCGAGGGATGAGAGTAGTGTATAAAGAGCAGTTACACAGCCCTCTCCTTG</u>	<u>CAGTCGAGTTGCTAAAAGC</u>	80
B. tournefortii orf263	<u>CAGTCGAGTTGCTAAAAGCACA</u>	<u>CTCGCAACAAGTCTCGAGTCACTCCGAGGAACGCCTTT</u>	80
R. sativus cox1	<u>TAAGTAGTTGAGTTAACGCCCTTTTCGCAACAAGTCTCGAGTCACTCCGAGGAACGCCTTT</u>	<u>TCAACCGAGTTGCTAAAAGC</u>	80
		↑	
R. sativus atp6	<u>ACCTCTCCTTTGCTGTTCGAGTAAACAAGAAATGCTCGAGTTACTAAACACCCCTAGGGGGCCCTCTCTGATAAGGAA</u>		160
B. tournefortii orf263	<u>ACCTCTCCTTTGCTGTTCGAGTAAACAAGAAATGCTCGAGTTACTAAATACCC- TAAGGGCCCTCTCTGATAAGGAA</u>		160
R. sativus cox1	<u>ACCTCTCCTTTGCTGTTCGAGTAAACAAGAAATGCTCGAGTTACTAAACACCCCTAGGGGGCCCTCTCTGATAAGGAA</u>		160
	R3		
R. sativus atp6	<u>AAAAACGAAAAAATCTCAAATTTATGAAAAATCTGGTTCGATGGCTGTTCTCCACAAACCACAAGGATATAGGGACTCTC</u>		240
B. tournefortii orf263	<u>AAAAACGAAAAAATCTCAAATTTATGAAAAATA</u>	<u>GACTCCAATGGCTATTACCCTGCTCGGTAGTTCCTAGCAGGTTTT</u>	240
R. sativus cox1	<u>AAAAACGAAAAAATCTTACATTTATGAAAAATCTGGTTCGATGGCTGTTCTCCACAAACCACAAGGATATAGGGACTCTC</u>		240
		↑	
R. sativus atp6	<u>TATTTCAITTTTCGGTGCCATTGCTGGAGTGATGGGCACATGCTTCTCAGTATTAATTCGGATGGAATTAGCAC</u>	<u>GACGTTT</u>	320
B. tournefortii orf263	<u>TTAG-----</u>	<u>GACGTTT</u>	251
R. sativus cox1	<u>TATTTCAITTTTCGGTGCCATTGCTGGAGTGATGGGCACATGCTTCTCAGTATTAATTCGATGGAATTAGCACGACCCGG</u>		320
		↑	
	R4		
R. sativus atp6	<u>TCTAGGATCAGAAGGAAGCGCTATTCTGACCACTACGTGCGTTTCATTCTTCGCACTGGTGGGCTTCCTATTTGGATTTC</u>		400
B. tournefortii orf263	<u>TCTAGGATCAGAAGGAAGCGCTATTCTGACCACTACGTGCGTTTCATTCTTCGCACTGGTGGGCTTCCTATTTGGATTTC</u>		331
R. sativus cox1	<u>CGATCAAATTTCTGGTGGGAATCATCAACTTTATAATGTTTTAATAACAGCTCATGCTTTTTTAATGATCTTTTTTATGG</u>		400
	R5		
R. sativus atp6	<u>ACATTTCTTCCTTTTCGTTTGAAGGACCCTGAGGGGGATTATCAAGATCTTCTT</u>	<u>GGTCTTTTTTCATCGCCGTAGTAATC</u>	480
B. tournefortii orf263	<u>GCATTTATTA</u>	<u>CTTTCGTTTGAAGGACCCTGAGGGGGATTCTCAATCTTCTCGTGGTCTTTTTTCATCGCCGTAGTAATC</u>	411
R. sativus cox1	<u>TTATGCCGCGATGATAGGTGGATTGGTAATTGGTTTGTTC-CGATTTCTGATAGGTGCACCTGCATGGCAATTTCCACG</u>		480
	R6		
R. sativus atp6	<u>TCITTTACTACGGATCGAAGTCATCCACCTACTGGTGGTCAGGCTTTGCCCTGTTGG</u>		537
B. tournefortii orf263	<u>TCITTTGATACGAATCAAAGTCATTTACCTAGTGAAT--CCGGCTTTGCCCTGTTGG</u>		465
R. sativus cox1	<u>ATTAATAATAATTTTCATTTCTGGTTGTGCCACCAAGTCTTGTCTCTATTAAAGCTC</u>		537

그림 7-2. *atp6* 유전자 주변의 short repeat sequences에 의해 일어나는 rearrangement. A; Comparison of three mtDNA units harboring common short repeats. Arrow-shaped boxes indicate the 5'-to-3' direction. The filled rectangular boxes (R2-R6) are short repeat sequences. *orf263-h*: homologous sequence of *Brassica tournefortii* *orf263* gene. B; Nucleotide sequence alignment of three mtDNA regions containing short repeat sequences. The short repeat sequences are enclosed with rectangular boxes. The vertical arrows indicate the putative breakpoints in crossing-over events.

2. DCGMS 음성불임 후보 유전자 탐색 및 유전자 분석

앞서 분석된 결과를 토대로 R2 및 R3 부분에서 genome walking을 통해 신규 ORF를 찾자 하였다. Genome walking은 1차 증폭을 R2 부분의 프라이머를 이용하여 증폭한 후 2차 증폭을 R3 부분의 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 그 결과 DCGMS에서만 2차 genome walking PCR product가 나오는 band를 확인 할 수 있었으며, 이를 elution하여 PCR fragment의 염기서열을 확보하였다(그림 7-3). 또한 확보된 PCR fragment의 염기서열을 기반으로 다시 5' 및 3' genome walking을 실시하여 전체 염기서열을 얻을 수 있었고, 이를 *orf463*이라 명명하였다.

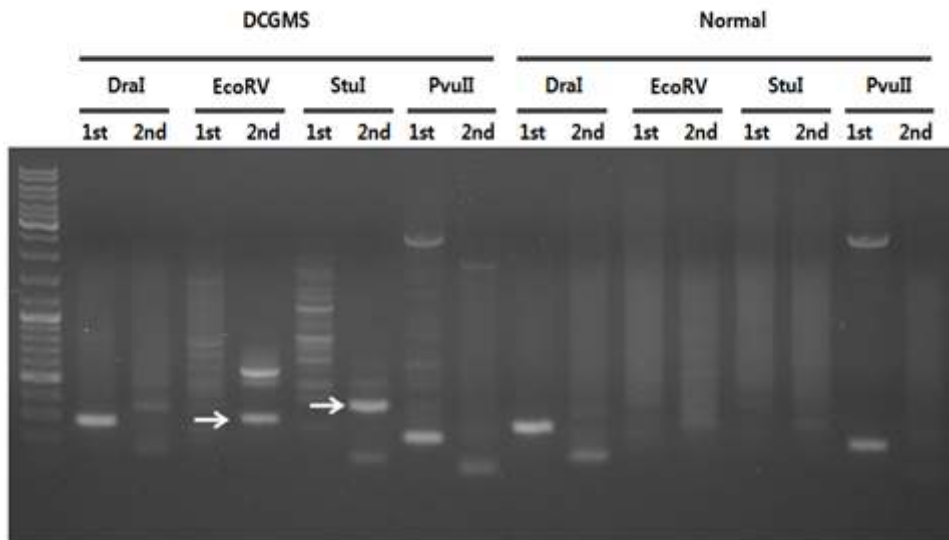


그림 7-3. Short repeat sequence를 기반으로 한 genome walking.

orf463 유전자는 총 1,389개의 염기(nucleotide)로 구성되어 있었으며, 단백질은 총 463개의 amino acid로 구성되어 있었다. 또한 전체 염기서열 분석 결과 ATG 이후 1 ~ 138 염기(1~46 amino acid)까지는 미토콘드리아 signal peptide를 가지고 있는 것을 확인 하였다. 또한 1~128 염기는 *coxI* 유전자의 5' 염기서열과 상동성을 보였으며 129번째 염기부터 1,389번째 염기는 기존에 알려지지 않는 신규 유전자였다. 129번째 염기부터 1,389번째 염기의 서열을 Blast N (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 분석 결과, query coverage 4 ~ 10% 수준에서 60 이하의 낮은 score로 다양한 유전자들이 검색되었다. 검색된 유전자 단편들은 동물, 식물, 미생물 유래의 다양한 유전자 단편들이었으며, 전반적으로 129번째 염기서열부터 1,389번째 염기서열과 상동성이 있다고 판단하기는 힘들었다. 또한 *orf463* 유전자 주변의 유전자 배열 구조를 확인해 보았을 때, *orf463* 유전자 앞부분에는 *atp6* 유전자가 배열되어 있고 short repeat sequence R2와 R3를 포함하며 R3 부분 이후에는 unknown 유전자가 위치하였다(그림 7-4).

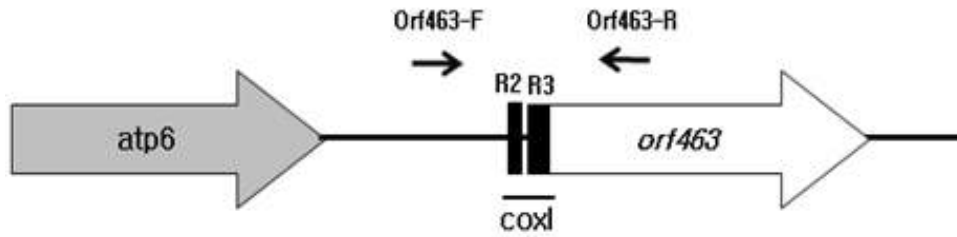


그림 7-4. *orf463* 주변의 유전자 구조.

orf463 유전자가 DCGMS에만 특이적으로 존재하는지를 확인하기 위하여 4개의 mitotype(DBRMF1, DBRMF2, Ogura, DCGMS)의 genomic DNA를 대상으로 PCR을 수행하여 확인하였다. 그 결과 신규 ORF인 *orf463* 유전자는 오직 DCGMS에서만 PCR이 증폭됨을 확인할 수 있었다(그림 7-5).

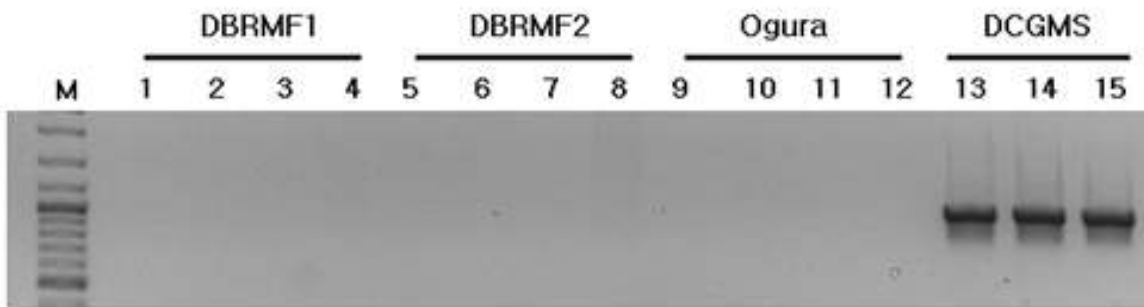


그림 7-5. 무의 mitotype에서 PCR을 통한 4가지 *orf463* 유전자의 존재 유무 확인 (프라이머 위치는 그림 7-4에 표기) M; 1Kb Leader, 1~4 lane; Plants of DBRMF1 mitotype, 5~8; Plants of DBRMF2 mitotype, 9~12; Plants of ogura mitotype, 13~15; Plants of DCGMS mitotype.

orf463 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR과 Northern blot을 통해 발현 검증을 실시하였다. RT-PCR의 경우 음성불임 DCGMS(MS-DCGMS)와 음성불임이 회복된 DCGMS(MF-DCGMS), 그리고 정상가임 세포질(DBRMF1) 개체의 꽃을 이용하여 만든 cDNA library를 이용하였다. 그 결과 정상가임 세포질을 가진 개체에서는 *orf463* 유전자가 발현이 되지 않았으나, 음성불임 DCGMS(MS-DCGMS)와 음성불임이 회복된 DCGMS(MF-DCGMS)에서 *orf463* 유전자가 발현되는 것을 확인하였다(그림 7-6). Northern blot을 통한 *orf463* 유전자의 발현 검증에서도 같은 결과를 얻었다(그림 7-7). 이러한 것은 Ogura 음성불임 유전자인 *orf138* 유전자의 특성과 같은 경향을 보이는 결과였다. 기존보고에 따르면 *orf138* 유전자는 음성불임 회복 유전자인 *Rfo* 유전자에 의해 음성불임 Ogura 개체와 음성불임이 회복된 Ogura

개체 간에서 transcription 수준에서 조절 되는 것이 아닌 translation 수준에서 조절된다고 하였는데, 이는 본 실험에서의 *orf463* 유전자의 발현 특성과 같은 결과였다(Grelon et al., 1994, Bellaoui et al., 1999)

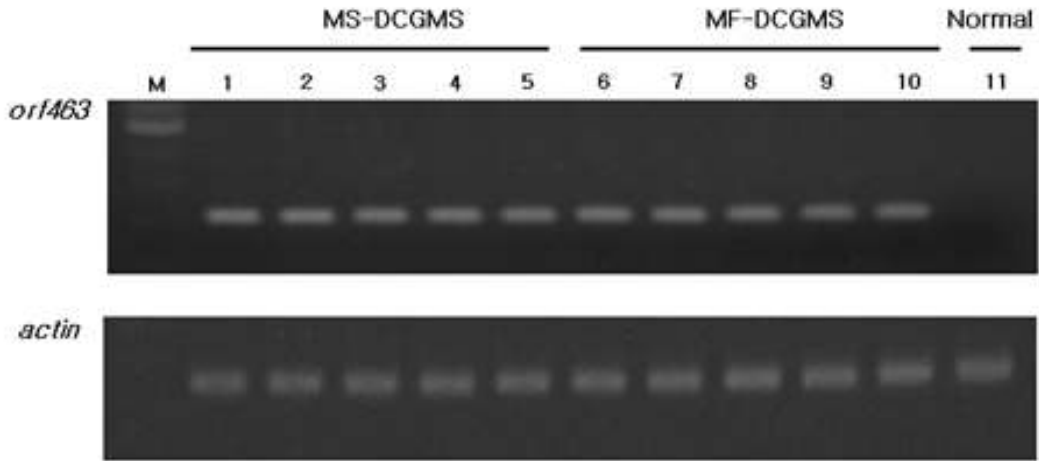


그림 7-6. *orf463* 유전자의 RT-PCR 결과. internal control로 actin 유전자 사용, M; 1Kb Leader, 1~5 lane; male-sterile DCGMS plants, 6~10 lane; male-fertile DCGMS plants, 11 lane; male-fertile normal cytoplasm(DBRMF1) plant.

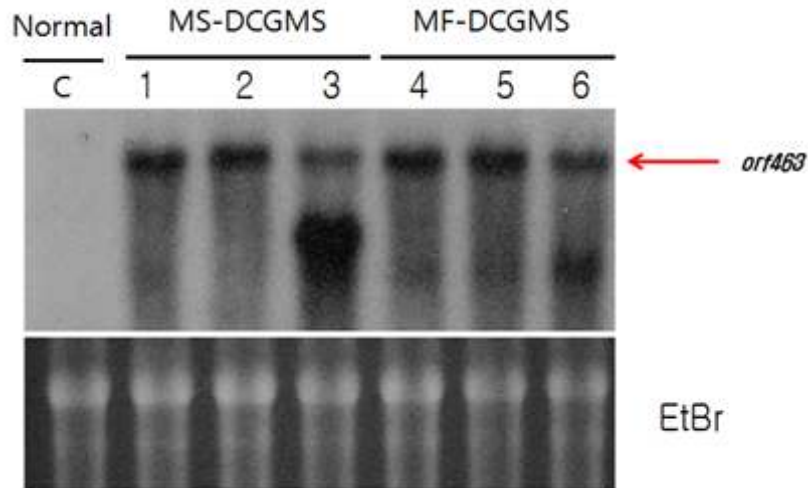


그림 7-7. *orf463* 유전자의 Northern blot 결과 (loading control로 EtBr 사용). C; male-fertile normal cytoplasm(DBRMF1) plant, 1~3 lane; male-sterile DCGMS plants, 4~6 lane; male-fertile DCGMS plants.

추가적으로 *orf463*의 아미노산 서열에 기초하여 단백질 구조적인 특성을 확인하였다. 분석은 TMHMM server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)fmf) 이용하여 transmembrane domain을 분석하였다. 그 결과 *orf463* 단백질은 총 12개의 transmembrane domain을 가지고

있었고 inner membrane과 outer membrane 간 코일 형태로 존재할 수 있는 구조를 가지고 있었다(그림 7-8). 즉 *orf463* 단백질은 mitochondria signal peptide를 가지고 있으며, 12개의 transmembrane domain을 가지고 있는 것으로 보아 mitochondria membrane에서 어떠한 역할을 할 수 있는 구조를 가지고 있는 것으로 판단되었다.

따라서 이러한 결과들로 미루어 보아 *orf463* 유전자는 DCGMS 음성불임 유전자일 확률이 높다고 판단되어졌고, 앞서 개발된 미토콘드리아/엽록체 식별 분자마커와 더불어 원형질체 callus의 선발에 분자마커로서 활용하였다.

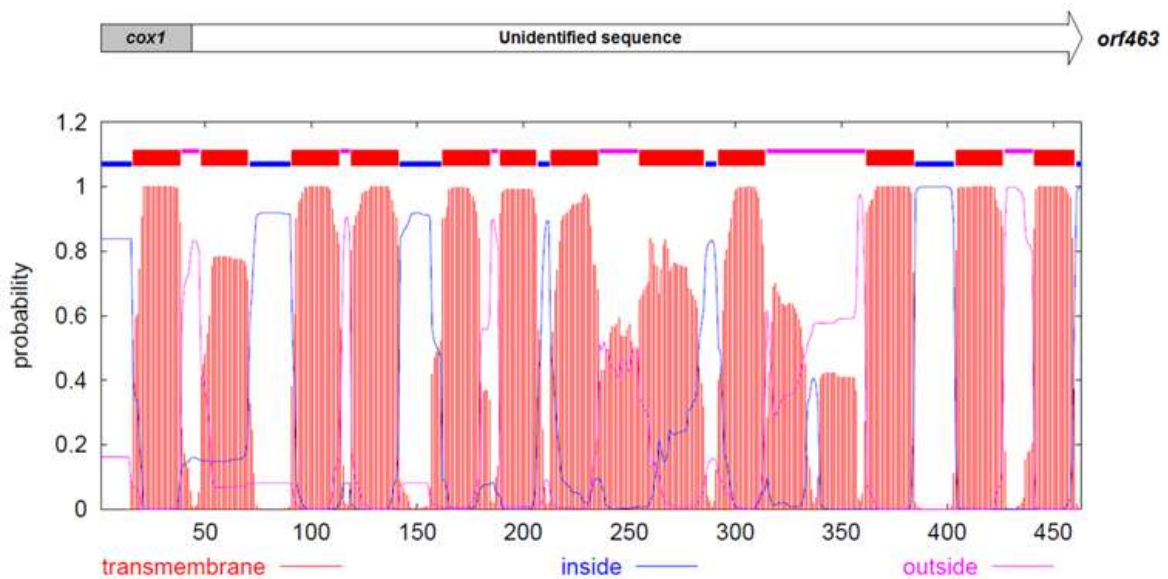


그림 7-8. *orf463* 유전자의 transmembrane domains 분석.

제 8 절. 신규 옹성불임 양배추 개발 및 특성 분석

원형질체 융합을 통해 생산된 callus의 일부를 앞서 기술한 DCGMS 미토콘드리아 식별 분자 마커, 엽록체 식별마커, *orf463* 유전자를 분석하였다. 분석 후 결과에서 DCGMS 미토콘드리아와 *orf463* 유전자가 전이되고, recipient(양배추/유채/브로콜리/배추)의 엽록체가 유지된 callus를 선발하여, 재분화를 거쳐 식물체를 생산하고자 하였다. 유채/브로콜리/배추의 경우 분자마커를 통해 지속적으로 선발하여 신초 유도 및 발근(rooting) 중에 있기 때문에 원예적 형질 검증에는 좀 더 시간이 필요한 실정이다. 그러나 양배추의 경우 2개 라인의 callus에서 총 8개체의 원형질체 융합 식물체를 생산하였다.

발근(rooting)까지 거쳐 순화된 원형질체 융합 양배추 식물체는 온실에서 재배하였다. 양배추의 특성상 개화를 시키려면 일정 크기의 구가 형성될 때까지 키운 후 저온처리를 해야 개화가 진행되기 때문에 유묘 상태의 원형질체 융합 양배추를 일정 기간 재배한 후 60일 가량 인공적으로 저온처리(7℃)를 하였다. 또한 옹성불임 양배추가 나왔을 때 교배를 할 꽃가루가 있는 교배친이 필요하기 때문에 교배친도 함께 파종하여 비슷한 시기에 저온처리를 수행하였다. 교배친은 해외 수집 유전자원 중 원예적 특성 검증에서 우수하다고 판단된 inbreed line을 선정하여 교배친으로 사용하고 싶어 하였고, 향후에도 지속적인 여교배로 우수한 inbreed line에 옹성불임성을 도입하고자 하였다. 현재 저온처리 후 유지되고 있는 총 8개체의 원형질체 융합 양배추 중 일부에서는 개화가 진행되고 있다(그림 8-1). 원형질체 융합 양배추를 다시 분자마커로 재분석한 결과, 모두 양배추의 엽록체와 DCGMS의 미토콘드리아를 가지고 있었다. 또한 옹성불임 유전자인 *orf463* 유전자를 모두 가지고 있었다(그림 8-2). 비록 생산된 원형질체 융합 양배추의 개체 수는 적지만 분자마커로 DCGMS 미토콘드리아만 전이된 것을 확인하였고, 옹성불임 후보 유전자 또한 전이된 것으로 확인되었기 때문에 저온황화 현상 등과 같은 부작용이 없는 옹성불임 양배추가 나올 것으로 기대했었다. 실제적으로 8개의 원형질체 융합 양배추는 약 60일간의 저온 처리에도 불구하고 저온황화 등과 같은 현상은 보이지 않았는데, 이는 원형질체 융합 양배추의 엽록체가 양배추의 엽록체이기 때문에 핵과의 부조화 현상이 일어나지 않았기 때문으로 판단된다.

이들 8개체 중에서 2개체는 현재 개화되어 화기를 관찰 할 수 있었고, 나머지 6개체는 아직 미개화된 상태이다. 개화 된 2개체는 모두 옹성불임성을 보였으며, 수술이 짧아지는 등, 정상적인 수술발달이 되지 않았다(그림 8-3). DCGMS와 양배추의 원형질체 융합을 통해 생산된 식물체의 수술은 꽃 발달 초기(stage 1)부터 수술 발달에 이상이 있었고, 꽃 발달 후기(stage 5)에

서도 정상적인 양배추 화기와는 전혀 다르게 수술이 퇴화된 모습을 보였다. 개화된 2개체 중 1개체는 정상 양배추와의 교배를 통해 종자까지 얻을 수 있었는데, 이는 수술은 퇴화되었지만 암술의 기능은 정상적이라는 것을 확인 할 수 있는 결과였다(그림 8-4). 이때 교배친으로 사용한 정상 양배추는 본 과제의 2년차에 수행된 수집 유전자원 평가에서 선발된 양배추 육종 자원을 사용하였다(9절의 해외 유전자원 수집 평가).

현재까지 확인한 융성불임 자원의 종자 생산능력은 인공 수분을 통해 확인한 결과이고, 추후 벌을 이용한 충매 교배를 통해서 F1 종자 채종 능력 시험을 진행할 예정이며, 신규 융성불임 자원 중 충매 교배에 의한 채종능력이 가장 좋은 자원들을 선발할 예정이다.

위와 같은 결과로 DCGMS 융성불임성을 양배추에 전이시켜 육종에 활용 가능한 새로운 융성불임 양배추 자원을 개발하는데 성공하였다. 신규 융성불임 양배추로 확인된 식물체의 callus는 2013년 2월 5일자로 한국 생명공학 연구원 유전자 은행에 기탁을 하였다(기탁번호:KCTC 12365BP).



그림 8-1. 온실에서 유지되고 있는 원형질체 융합 양배추 식물체.



그림 8-2. 미콘드리아/엽록체 식별 마커 및 *orf463* 유전자를 이용한 DCGMS와 양배추의 원형질체 융합 양배추 식물체 재분석. C1; DCGMS radish, C2; normal cabbage, 1~8 lane; protoplast fusion cybrid plants (Cabbage) between DCGMS and Cabbage.

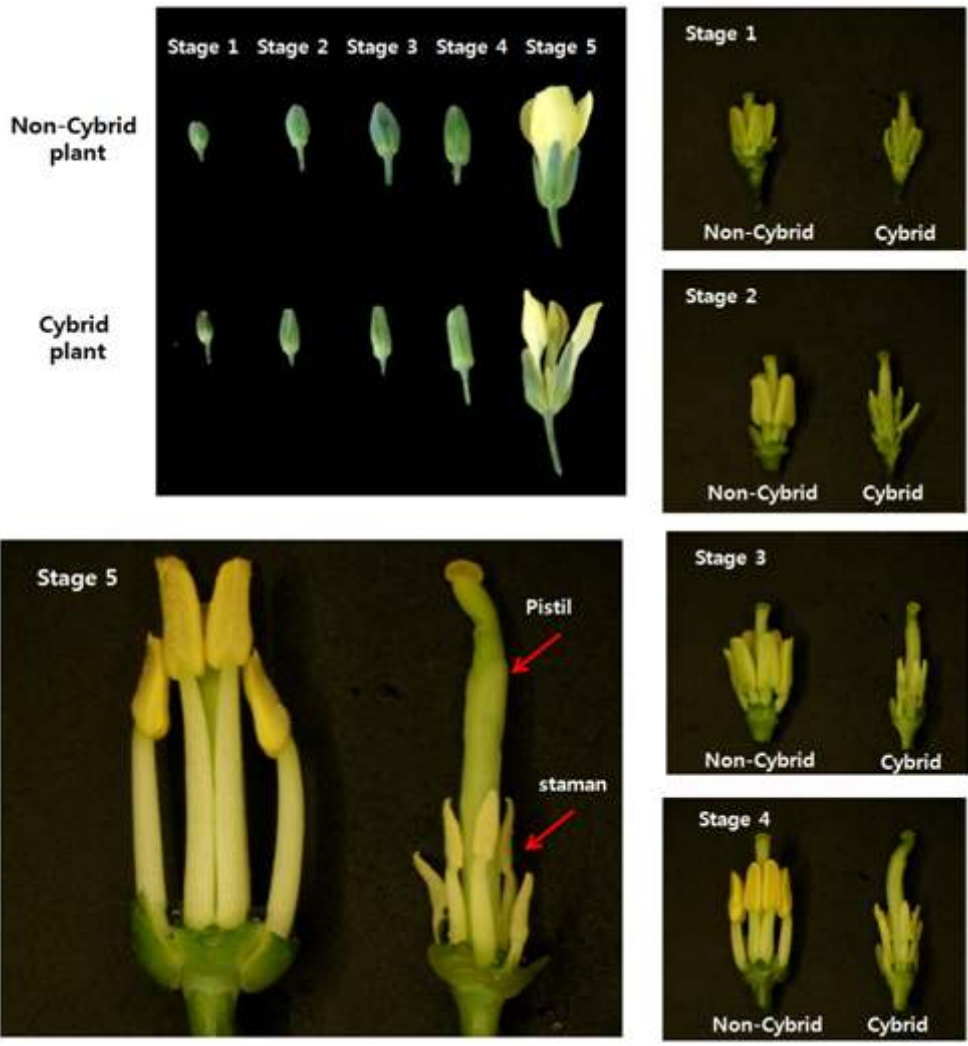


그림 8-3. CGMS와 양배추의 원형질체 융합 양배추 식물체의 화기 구조 분석.



그림 8-4. 원형질체 융합 음성불임 양배추 식물체와 정상 가임 양배추와의 교배를 통한 종자 생성 여부 확인.

제 9 절. 십자화과 유전자원 수집 및 특성 분석

본 연구에서는 원형질체 융합을 통해 생산된 융성불임 식물체의 조기 상용화를 위해 국내/해외 육종자원 수집 및 특성평가를 실시하였다. 또한 특성 평가를 통해 선발된 유전자원은 융성불임 식물체가 생산되었을 때 교배친으로 활용하고자 하였다. 유전자원에 대한 특성 평가는 1년차와 2년차에 집중적으로 실시를 하여 미리 교배친으로 사용할 육종 자원을 선발하고, 융성불임 식물체가 확보 되면 식물체 유지 및 계통 고정을 위해 활용하고자 하였다.

1. 해외 유채 유전자원 수집 및 유전자원 기탁

1년차에는 중국에서 유채 육종자원 27종을 수집하여 총 1200개체를 노지에서 재배하여 그 특성을 조사하였다. 재배 특성 조사는 대전 동부기술원에서 실시하였으며, 특성평가는 모두 동일한 환경에서 조사하여, 종자의 수량성 및 만생종/조생종 등을 조사하였다. 수집된 유채 종자는 2008년 10월 15일 정식을 하여 매달 특성 조사를 하였고, 평균 온도가 $-2 \sim -3^{\circ}\text{C}$ 정도되는 12월에서부터 2009년 1월 말까지는 휴면에 들어가는 특징을 보였고, 평균 온도가 $3 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 정도가 되는 2009년 2월~3월에 점차 생육이 왕성해지고 추대가 되는 특징이 있었다(그림 9-1). 병충해 발생은 평균 기온이 $11 \sim 12^{\circ}\text{C}$ 정도인 11월 중순까지 배추 좀나방이 발생하였으나 큰 피해를 주지 않았고, 이 기간에 2회의 작물보호제 살포만으로도 병충해 방제가 되었다. 또한 수확기인 4월까지 작물보호제 방제 없이 별다른 병충해 발생이 없었다.

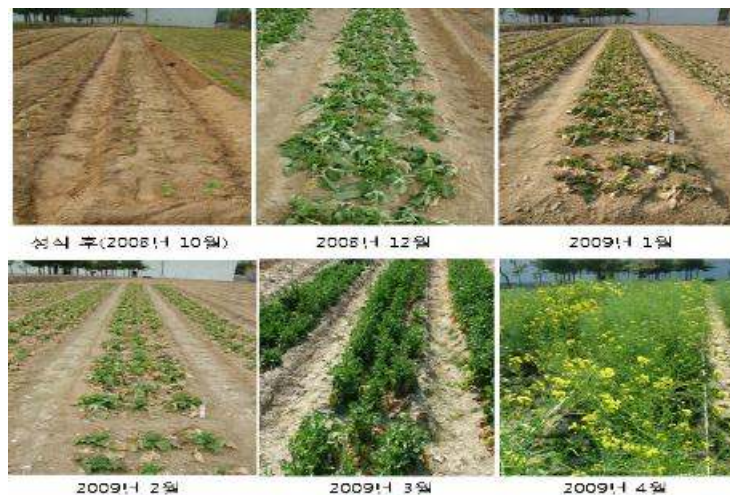


그림 9-1. 수집된 유채의 생육 및 특성 조사.

수집된 유채 자원의 만추대성을 조사하기 위하여 4월 22일 기준으로 27 line의 개체군간의 개화 비율과 seed setting 비율을 조사하여 만생종 육종자원과 조생종 육종자원을 조사하였다.

조사는 총 5등급으로 나누어 seed setting 비율이 90% 이상이면서 개화비율이 10%이하인 개체군은 극조생, seed setting 비율이 90~70% 이면서 개화비율이 30~10%인 개체군은 조생 품종으로 구분하였다. 또한 seed setting 비율이 30~10% 이면서 개화비율이 90~70%인 개체군은 만생 품종으로 구분하고, seed setting 비율이 10% 이하이면서 개화비율이 90%이상인 개체군은 극만생종으로 구분하였다.

본 조사에서 27개 line 중 1개 line은 생육 불량으로 정상발육이 되지 않았으며, 총 26개 line에서만 특성 조사를 할 수 있었다. 결과적으로 극조생에 해당하는 line은 5개 line(DBN #3, #5, #8, #9, #10) 이였으며, 조생중에 해당하는 line은 4개 line(DBN #1, #2, #4, #7) 이였다. 반대로 만생중에 해당하는 line은 6개 line(DBN #6, #11, #15, #18, #23, #26) 이였으며, 극만생중에 해당하는 line은 11개 line(DBN #12, #13, #14, #16, #17, #19, #20, #21, #22, #24, #25)으로 가장 많은 분포를 보였다(표 9-1).

표 9-1. 수집된 유채의 개화 및 seed setting 비율에 따른 특성 조사

Cultivar Name	Seed setting 비율(%)	개화비율(%)	Cultivar Name	Seed setting 비율(%)	개화비율(%)
DBN#1	80	20	DBN#14	10	90
DBN#2	70	30	DBN#15	20	80
DBN#3	95	5	DBN#16	0	100
DBN#4	70	30	DBN#17	0	100
DBN#5	95	5	DBN#18	20	80
DBN#6	30	70	DBN#19	0	100
DBN#7	85	15	DBN#20	10	90
DBN#8	95	5	DBN#21	10	90
DBN#9	95	5	DBN#22	10	90
DBN#10	95	5	DBN#23	20	80
DBN#11	20	80	DBN#24	10	90
DBN#12	10	90	DBN#25	10	90
DBN#13	10	90	DBN#26	30	70

생육 불량으로 특성 조사를 할 수 없었던 1개 line을 제외한 총 26개 line의 수협수와 협당종자수, 그리고 200립당 종자의 무게를 계산하여 각 자원의 특성을 조사하였다. 조사는 각 line별 가장 생육상태가 좋은 3개체를 선별하여 각각의 평균과 표준편차를 구하였다. 수협수는 개체별 종자 꼬투리의 수를 계산하였으며, 협당종자수는 꼬투리당 종자의 수를 계산하였다(표 9-2).

표 9-2. 수집된 유채 유전자원의 종자 생산량 특성 조사

계통명	수협수		협당종자수		200립당 무게	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD
DBN#1	664	133	24	1	943	25
DBN#2	709	177	25	1	917	32
DBN#3	559	100	22	3	940	95
DBN#4	581	276	22	2	1017	145
DBN#5	378	55	23	4	1020	66
DBN#6	651	193	22	1	1023	40
DBN#7	447	128	19	2	1150	85
DBN#8	527	81	23	4	1080	85
DBN#9	353	114	21	2	1013	38
DBN#10	354	59	16	3	1280	95
DBN#11	791	279	16	1	980	26
DBN#12	417	85	20	3	1037	42
DBN#13	451	126	20	4	883	65
DBN#14	1124	259	20	3	677	68
DBN#15	142	11	17	5	820	14
DBN#16	587	0	21	0	1130	0
DBN#17	502	0	21	0	1220	0
DBN#18	221	74	17	4	1265	64
DBN#19	442	0	16	0	1230	0
DBN#20	249	85	16	4	1230	57
DBN#21	176	9	15	2	1225	35
DBN#22	922	168	14	2	830	141
DBN#23	737	75	18	3	930	85
DBN#24	455	44	17	2	965	148
DBN#25	860	39	28	3	1110	113
DBN#26	603	256	19	2	915	49

일부 수집자원들은 종자 생산성이 뛰어나고 원예적 특성이 좋은 것을 확인 하였고, 이중 총 10종의 유전자원을 한국 생명공학연구원에 기탁하였다(그림 9-2).



안성시 양성면 덕봉리 158-14번지
/Tel(031)674-6911/Fax(031)674-6916/이메일(youngpyo@dongbu.com)

발신번호 : 육종연구소 제14 -아-시 호 2014. 1. 28(화)

수 신 : 한국생명공학연구원 바이오인프라총괄본부 미생물자원센터
참 조 : 한국생명공학연구원 바이오인프라총괄본부 미생물자원센터 생물자원 기탁 담당자
제 목 : 연구성과물(유전자원) 기탁 신청

1. 귀 원의 무궁한 발전을 기원합니다
2. 당사에서 수행 중인 “비대칭원형질체 융합 기술을 통한 중성불임 육종 자원 개발” 과제의 일환으로 해외에서 수집된 유전자원에 대한 기탁을 신청하오니 검토 요청 바랍니다.

- 아 래 -

1. 과 제 명: 비대칭원형질체 융합 기술을 통한 중성불임 육종 자원 개발
(주관기관/연구책임자: 동부팜한농/성순기, 협동기관/연구책임자: 한국생명공학연구원/유정원)
2. 기탁물
- 유전자원 수집 종자 12종(유채 10종, 양배추 2종)
4. 유첨 자료
- 생물자원 기탁 계약서 2부
- 연구성과물 기탁 신청서 2부
- 자원별 기탁 신청서 12부

끝.

주식회사 동부팜한농 대표이사



그림 9-2. 수집 유전자원 기탁 공문.

2. 해외 양배추 유전자원 수집 및 유전자원 기탁

본 과제의 2년차에는 중국에서 수집한 총 23종의 양배추 유전자원을 대상으로 특성 검정을 실시하였다. 재배 특성 검정은 동부팜한농 안성 육종연구소에서 실시를 하였으며 파종은 2월 23일에 실시하여 4월 9일에 정식을 하였다. 그리고 6월 14일에 특성 조사를 완료 하였다.



그림 9-3) 수집된 양배추의 생육 및 특성 조사.

양배추의 특성 조사는 외엽수, 엽장, 엽폭, 구중, 구고, 구경, 심고 등 다양한 재배 특성 항목을 조사하였으며(표 9-3), 그 중 조생계 육종 자원 2종을 선발하여 한국 생명공학연구원에 기탁하였다(그림 9-2). 또한 본 과제를 통해 개발된 신규 음성불임 양배추의 교배친으로 사용하여 현재 BC₁F₁을 진행 중이다.

표 9-3. 수집된 양배추의 특성 조사표

NO	외엽수 (매)	엽장 (Cm)	엽폭 (Cm)	구중 (g)	구고 (Cm)	구경 (Cm)	심고 (Cm)
CB1	18	35	35.5	1100	13.5	16	7
CB2	12	33	29	1700	17	16	9
CB3	19	33	35	950	14	15.5	7.5
CB4	17	34	34	1400	16	15.5	6
CB5	11	37	35	1550	16	17.5	7.5
CB6	19	43	36	1000	13.5	15	6.5
CB7	18	39	35	1200	13.5	16	8
CB9	10	34	35.5	1600	15.5	16.5	7
CB10	9	37	37	1700	17	17.5	7
CB11	8	37	37	1750	16	16.5	9
CB20	10	38	36	1600	16.5	16.5	7.5
CB38	15	39	36	900	16	17	6
CA16	14	33	33	1200	13.5	15	5.5
CA17	19	44	43.5	900	14	14	5.5
CA21	17	32	30	1050	13	14	5.5
CA22	14	36	35	1450	15	16.5	6
CA44	15	37	33	1100	15.5	15.5	5.5
CA45	14	36	35.5	1100	14.5	15	6
CA46	11	31	37	1850	16	16.5	6
CI5	22	36	36	1050	14	15	4.5
CI20	16	34	34	1350	15	15	6.5
CI22	15	37	37.5	1550	16	16.5	5.5
CI26	16	35	35	1400	14.5	17	6

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 과제에서는 원형질체 융합 callus를 조기에 판별할 수 있는 시스템 개발과 무 옹성불임 라인(DCGMS) 및 십자화과 (양배추, 유채, 브로콜리, 및 배추) 작물의 원형질체 분리 및 원형질체로부터 식물체 재생 체계를 확립하고자 하였다. 또한 옹성불임 무와 각 십자화과 작물별 핵 및 세포질 불활성화 체계를 확립한 다음 이들의 비대칭원형질체 융합 및 배양을 통하여 옹성불임 cybrid 식물체 개발 체계를 확립하고자 하였다. 더 나아가 DCGMS 옹성불임 후보 유전자 탐색 및 cybrid 식물체 생산 효율을 증대함으로써 개발된 옹성불임 cybrid 식물체 라인들이 십자화과 채소의 중간모본으로서 활용될 수 있는 체계를 확립하고자 한다. 본 과제의 최종 목표는 원예적 검증을 통해 상업 육종에 활용할 수 있는 신규 옹성불임 자원을 개발하는데 있다.

1절 연구목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2009)	제1세부과제 분자마커를 이용한 옹성불임 자원 분류 시스템 구축	유전자원 수집/특성검정	100	유채 수집자원 27개 line(1200개체) 특성조사 완료 생육특성, 종자 생산량, 조생/만생 품종 분석
		십자화과 옹성불임 세포질 분 류 시스템 개발	100	Ogura, Polima, nap 옹성불임 자원 식별 분자마커 개발 완료. 개발된 분자마커를 이용한 수집자원의 세포질 분석 완료
		무 옹성불임자원 세포질 분류 시스템 개발	100	무(DCGMS) 미토콘드리아 및 엽록체 분류 분자마커 개발 무 미토콘드리아 genome scanning 방법 구축
	제1협동과제 비대칭원형질체 융합 기술을 이용한 옹성불임 자원 생산	무 callus 및 기내배양체계 확립	100	무균 발아된 소식물체의 자엽 및 배측으로부터 callus 유도 및 증식 체계 확립하였음
		무 기내발아 식물체 대량 확 보	100	표면살균을 통한 무균 발아 및 소식물체 배양체계 확립하였음
		무 callus 및 유식물체(자엽, 배측 등)로부터 원형질체 분	100	무 소식물체(자엽 및 배측)로부 터 세포벽 분해효소의 종류 및

		리 조건 확립		농도, 삼투보호제 탐색 등의 조건을 확립하여 무 원형질체 분리체계 확립하였음
		양배추/유채/브로콜리 callus 및 기내배양체계 확립	100	무균 받아된 소식물체의 자엽 및 배측으로부터 callus 유도 및 증식체계 확립하였음
		식물체 분화능 우수 순계라인 선발	100	각 작물별 무균 받아된 소식물체의 자엽 및 배측으로부터 callus 유도 및 증식체계 확립하였음
		callus 및 유식물체 조직으로부터 기관 분화를 통한 식물체 재생 체계 확립	100	원형질체 배양을 통해 얻어진 각 작물의 callus로부터 BA 처리를 통한 녹색 callus 유도 및 shoot 발달을 조사
		callus 및 유식물체(자엽, 배측 등) 조직으로부터 원형질체 분리 조건 확립	100	유채, 배추, 브로콜리 및 양배추,의 유식물체(자엽)로부터 세포벽 분해효소의 종류 및 농도, 삼투보호제 탐색 등의 조건을 확립하여 원형질체분리 체계를 확립하였음
2차 년도 (2010)	제1세부과제 분자마커를 이용한 옹성불임 자원 분류 시스템 구축	유전자원 수집/특성 검정	100	-유전자원 수집 및 특성 검정 (전문 육종가 검정) -조기 상용화를 위한 우수 육종 자원 선발(유전자원 특성에 따른 분류 실시) -십자화과 옹성불임 세포질마커를 이용한 수집자원 분석
		Cybrid 식물체 판별 분자마커 개발	100	-엽록체 분리방법 구축(Kit 사용) -배추/양배추/유채/브로콜리의 세포질 판별 분자마커 개발 -배추/양배추/유채/브로콜리의 세포질 genome scanning 방법 구축
		DCGMS 옹성불임 단백질 탐색	100	-DCGMS 불임/가임 집단 간 단백질 분석을 통한 옹성불임 단백질(유전자) 탐색

	제1협동과제 비대칭원형질체 융합 기술을 이용한 옹성불임 자원 생산	양배추/유채/브로콜리 원형 질체로부터 식물체 재생체 계 확립	100	-원형질체 유래 callus의 신초 분화 조건 탐색 (생장조절제, 무기염류 농도 등) -양배추/유채/브로콜리/배추 원형질체형질체로부터 식물체 재생 조건 규명 (배지조성, 생 장조절제, 배양환경요인 등)
		무 원형질체의 핵제거 기술 개발	100	-무 원형질체의 효율적인 핵 불활성화 체계 확립을 위하여 식물체 배양 환경 조건, explant 종류, 감마선 세기, 감 마선 처리 시간 등 제반 요인 규명
		양배추/유채/브로콜리 원형질 체의 세포질 불활성화 기술 개발	100	-양배추/유채/브로콜리/배추 원형질체로부터 세포질 불활성 화 체계 확립을 위하여 explant 종류 및 배양환경 요 인, IOA 처리농도 및 처리 시 간 등 제반 요인 규명
		Donor(무) 와 recipient(양배 추/유채/브로콜리) 원형질체 의 융합 체계 확립	100	-핵 불활성화된 Donor(무)와 세 포질 불활성화된 recipient(양배 추/유채/브로콜리/배추) 원형질 체 사이의 비대칭 원형질체 융 합 체계 확립을 위하여 전기 융 합의 pulse length, 전기 세기, 융합 buffer 조성 등 제반 요인 규명
3차 년도 (2011)	제1세부과제 분자마커를 이용한 옹성불임 자원 분류 시스템 구축	유전자원 수집/특성 검정	100	-양배추 해외 수집자원 26 line 의 원예적 형질 검정 -유채 수집자원의 내한성/수량 성 평가
		Cybrid 식물체(clallus)관별 분자마커 개발 및 최적화	100	-미토콘드리아 식별 마커 총 6 종의 마커 개발 -엽록체 식별 마커 총 6종의 마 커 개발 -식물체 뿐만아니라 callus 단계 에서도 조기 선발이 가능한 시

				스텝 구축
		분자마커를 이용한 Cybrid 식물체(clallus) 세포질 판별	100	- 제1협동연구기관으로부터 생산된 cybrid 식물체 및 callus 세포질 판별 - 양배추 callus 106개, 배추 callus 12개, 브로콜리 callus 11개, 유채 callus 1개 분석 (양배추 10개, 배추 2개, 유채 1개, 브로콜리 1개 cybrid callus 확보)
	제1협동과제 비대칭원형질체 융합 기술을 이용한 옹성불임 자원 생산	Donor(무) 와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 원형질체의 융합 체계 개발	100	- 원형질체의 전기융합 조건 (pulse length, 전기 세기 등 전기적 조건, 융합 버퍼의 조성) 탐색 및 효율적인 비대칭 원형질체융합 체계 확립 - 세포질 불활성화 조건 등 원형질체 제반 요인의 미세 조건 규명 - 방사선 세기에 따른 융합 세포의 분열 효율 조사 및 배양 효율 증진 요인 규명
		Donor(무) 와 recipient(양배추/유채/브로콜리배추) 융합 원형질체로부터 식물체 재생 기술 개발	100	- 융합 원형질체 배양 효율 증진 요소 규명(화학물질 첨가, 신규 종자 라인 재분화 조건 등) - 융합 원형질체 유래 callus로부터 cybrid 식물체 재생 조건 규명(배지 조성, 성장조절제, 배양환경요인 등)
4차 년도 (2012)	제1세부과제 분자마커를 이용한 옹성불임 자원 분류 시스템 구축	DCGMS 옹성불임 유전자 개발	100	- DCGMS 미토콘드리아 분석 - DCGMS 특이적 신규 ORF 탐색 - DCGMS 특이적 유전자에 대한 유전자 발현 분석 및 단백질 구조 분석
		분자마커를 이용한 Cybrid 식물체(clallus) 세포질 판별	100	- Cybrid 양배추/유채 callus의 분자마커 분석 - Cybrid callus 중 DCGMS 미토콘드리아만 전이된 callus선발

		Cybrid 양배추 원예적 특성 평가	90	<ul style="list-style-type: none"> - Cybrid callus로부터 얻은 양배추 재배 및 저온처리 - Cybrid callus로부터 얻은 양배추의 분자마커 분석 (DCGMS 무의 미토콘드리아만 전이됨을 확인) - 추대 검증을 통한 융성불임 여부 확인
	제1협동과제 비대칭원형질체 융합 기술을 이용한 융성불임 자원 생산	Donor(무) 와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 융합 원형질체로부터 식물체 재생 효율 증대	100	<ul style="list-style-type: none"> - 융합 원형질체 유래 callus의 식물체 재생 조건 규명(배지 조성, 성장조절제, 배양환경요인 등) - 융합 원형질체 유래 callus의 신초 분화 조건 규명(성장조절제, 무기염류 농도 등)
		Donor(무) 와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 융합 원형질체로부터 cybrid 식물체 생산 증대	100	<ul style="list-style-type: none"> - 확립된 원형질체 융합 및 cybrid 식물체 재생 조건으로부터 반복 수행을 통해 donor(무)와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) cybrid 식물체 다수 확보
5차 년도 (2013)	제1세부과제 분자마커를 이용한 융성불임 자원 분류 시스템 구축	Cybrid 식물체 세포질 (callus) 판별	100	<ul style="list-style-type: none"> - 제 1협동과제팀에서 생산된 cybrid 식물체의 세포질 판별 - Cybrid callus 선발
		Cybrid 식물체 원예특성 조사		<ul style="list-style-type: none"> - Cybrid 식물체의 원예 특성 조사 (융성불임성, 저온 황화현상, 암술/꽃잎 발달 구조 특성 조사) - Cybrid 식물체의 실용화 가능 여부 분석완료 - 우수 계통의 여교배를 통한 융성불임 cybrid 식물체의 중간 모본 2중 확보 완료

	<p>제1협동과제</p> <p>비대칭원형질체 융합 기술을 이용한 옹성불임 자원 생산</p>	<p>Donor(무) 와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 융합 원형질체로부터 식물체 재생 효율 증대</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 융합 원형질체 유래 callus의 식물체 재생 조건 규명(배지 조성, 성장조절제, 배양환경요인 등) - 융합 원형질체 유래 callus의 신초 분화 조건 규명(성장조절제, 무기염류 농도 등) - 브로콜리/배추에 대한 연구 집중으로 식물체 재생 효율 증대
		<p>Donor(무) 와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) 융합 원형질체로부터 cybrid 식물체 생산 증대</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 융합 원형질체 유래 callus DNA의 FT-IR 분석으로 정상 식물체와 원형질체 융합을 통해 생성된 식물체를 판별하여 현행 cybrid 마커 검정 체계 보완 가능 - 세포질 판별과 DNA FT-IR로 검정된 cybrid line을 효율적으로 관리하여 cybrid plant 생산 효율 증대 - 확립된 원형질체 융합 및 cybrid 식물체 재생 조건으로부터 반복 수행을 통해 donor(무) 와 recipient(양배추/유채/브로콜리/배추) cybrid 식물체 2종 이상 다수 확보

2절 관련 분야 기여도

1. 십자화과 옹성불임 식물체 라인 개발

본 연구과제를 통해 무의 옹성불임 유전자가 도입된 신규 옹성불임 cybrid 양배추 라인은 고순도/고품질 양배추 F1 종자 생산을 위한 중간모본으로서 육종의 소재로 직접적인 활용이 가능하여 현재까지 경쟁력을 가지 못했던 양배추 종자 시장의 국제 경쟁력을 확보 할 수 있는 계기가 될 것임. 아울러 양배추 옹성불임 라인의 경우는 브로콜리 등 타 십자화과 작물에 유성생식을 통해 전이가 가능하여 브로콜리 등 다양한 십자화과 자원의 옹성불임 중간 모본으로서

자원의 활용이 가능할 것으로 기대됨.

아울러 본 연구과제를 통해 개발된 유채 및 배추 cybrid 식물체 및 이의 생산 기술은 향후 유채 및 배추 종자시장에서 국내 종자산업의 기술력 향상은 물론 최근 F1 종자시장이 계속 확대되고 있는 중국, 인도 종자시장 진입을 위한 신품종 개발에 활용 가능하므로 국내 종자 기업의 글로벌 경쟁력 확보에 큰 기여를 할 것임.

2. 원형질체 융합을 통한 옹성불임 식물체 개발 기술

본 연구 개발에 사용되는 무 옹성불임자원(DCGMS)와 비대칭 융합기술을 이용한 중간교잡 식물체 생산기술의 개발은 독창적인 육종 시스템이므로 이를 십자화과 식물에 적용함으로써 독자적인 지적 재산을 확보하게 되고 종자 산업의 국가 경쟁력을 향상에 기여할 것임. 또한 본 연구과제에서 확립된 비대칭 원형질체융합 기술은 십자화과 채소작물은 물론 현재 신품종 종자 개발을 위해 다양한 연구가 진행되고 있는 식량작물이나 원예작물에도 쉽게 기술전이가 가능하여 작물 신품종 개발 기술로서 효과적으로 응용이 가능할 것임.

3. Cybrid 식물체 분석 및 세포질 융합 패턴 분석

본 연구를 통해 세포질 불활성화처리가 이루어진다 하더라도 개발된 식물체 라인별로 donor와 recipient 간의 세포질 유전자(엽록체 및 미토콘드리아)의 조합 패턴이 다양함을 알 수 있음. 이 결과는 세포질 유전자의 혼합에 따라 유전자 수준에서 이들 사이에 상호 경쟁을 통한 특정한 유전자 패턴의 우점 기작이 존재함을 나타내는 것으로 세포질 유전자의 상호 경쟁 및 우점에 관련된 진화생물학적 연구 소재로 활용이 가능할 것으로 기대됨.

아울러 genomic DNAs 시료로부터 적외선분광 스펙트럼 분석을 통한 cybrid 식물체 식별 체계 및 십자화과 생물종 사이의 식별 패턴은 생물종 genome의 구조적 특성 분석은 물론 진화적 측면을 연구할 수 있는 새로운 단서를 제공할 수 있을 것으로 기대됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절 연구 개발 성과

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 수입 수	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표									
	달성	3					1			
2차년도	목표								1	
	달성		1				1			
3차년도	목표	1					2	1	1	
	달성	2	1						1	
4차년도	목표	1					4	2		
	달성		1					1		
5차년도	목표	3	1				4	2		
	달성						13	1		
계	목표	5	1				10	5	2	
	달성	5	3				13	4	1	

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구계획에 따라 도출된 것으로 예시와 같이 작성

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표					
	달성					

나. 논문게재 성과

게재연 도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	Identification of highly variable chloroplast sequences and development of cpDNA-based molecular markers that distinguish four cytoplasm types in radish (<i>Raphanus sativus</i> L.)	이영표	성순기	김성길, 임희래, 안영순	<i>Theor. Appl. Genet.</i>	119	국외	SCI
2010	Identification of Rfd1, a novel restorer-of-fertility locus for cytoplasmic male-sterility caused by DCGMS cytoplasm and development of simple PCR markers linked to the Rfd1 locus in radish (<i>Raphanus sativus</i> L.)	김경문	김성길	이영표 성순기	<i>Euphytica</i>	175	국외	SCI
2011	Myo-inositol increases the plating efficiency of protoplast derived from cotyledon of cabbage (<i>Brassica oleracea</i> var. capitata).	Eun Yee Jie	Jang Ryol Liu	Suk Weon Kim, Hye Rim Jang, Dong Su In	<i>J Plant Biotechnol ogy</i>	38: 69-76	국내	비SCI
2012	Construction of a high-resolution linkage map of Rfd1, a restorer-of-fertility locus for cytoplasmic male sterility conferred by DCGMS cytoplasm in radish (<i>Raphanus sativus</i> L.) using synteny between radish and Arabidopsis genomes	조영초	김성길	이영표 박범석 한태호	<i>Theor. Appl. Genet.</i>	125; 467-4 77	국외	SCI
2013	Complete mitochondrial genome sequence and identification of a candidate gene responsible for cytoplasmic male sterility in radish (<i>Raphanus sativus</i> L.) containing DCGMS cytoplasm	이영표 박지영	양태진	김성길 이정훈 최범순 김성길	<i>Theor. Appl. Genet.</i>	126; 1763- 1774	국외	SCI

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2009	무 세포질 관별용 엽록체 DNA 마커	(주)동부하이텍	대한민국	10-2009-32110
2009	A Method for producing a hybrid seed using plant of novel Cytoplasmic-Genic Male Sterility Raphanus sativus line and DNA markers for selecting the plant of said Raphanus sativus line	(주)동부하이텍	일본	2010-502028
2009	A Method for producing a hybrid seed using plant of novel Cytoplasmic-Genic Male Sterility Raphanus sativus line and DNA markers for selecting the plant of said Raphanus sativus line	(주)동부하이텍	중국	200880016071.3
2011	A Method for producing a hybrid seed using plant of novel Cytoplasmic-Genic Male Sterility Raphanus sativus line and DNA markers for selecting the plant of said Raphanus sativus line	(주)동부한농	캐나다	2,720,710
2011	A Method for producing a hybrid seed using plant of novel Cytoplasmic-Genic Male Sterility Raphanus sativus line and DNA markers for selecting the plant of said Raphanus sativus line	(주)동부한농	영국	1111840.3

등록된 특허의 경우				
등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009	신규한 세포질-유전자적 음성 불임 (CGMS) 무 계통식물체를 이용한 잡종 종자 생산 방법 및 상기 무 계통식물체 선발용 DNA 표지 인자	(주)동부하이텍	대한민국	1008850750000
2011	무 세포질 관별용 엽록체 DNA 마커	(주)동부한농	대한민국	1010911570000
2012	A Method for producing a hybrid seed using plant of novel Cytoplasmic-Genic Male Sterility Raphanus sativus line and DNA markers for selecting the plant of said Raphanus sativus line	(주)동부한농	일본	JP5089764

2절 연구 성과 활용 계획

1. 신규 음성불임 cybrid 양배추 식물체 활용 계획

양배추의 세계 총 재배면적은 2,084천 ha이고, 중국이 약 70만 ha로 가장 크며, 인도(20만 ha)와 유럽(20만 ha) 순으로 재배면적이 높다. 중국의 경우 양배추 종자 가격은 약 100불/kg

수준이나 일부 고순도/고품질의 종자의 경우 2,000불/kg까지도 가격이 형성 되어있어, 제품 경쟁력이 부가가치에 매우 큰 영향을 준다. 그러나 양배추의 경우에는 자가불화합이 매우 약해 고순도의 F₁종자 생산이 매우 어려운 실정이다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 신규 옹성불임 cybrid 양배추 육종자원은 고순도/고품질 양배추 F₁ 종자 생산을 위한 육종의 소재로 직접적인 활용이 가능하여 현재까지 경쟁력을 가지 못했던 양배추 종자 시장의 국제 경쟁력을 확보 할 수 있는 계기가 될 것이다. 특히 본 과제를 통해 개발된 신규 옹성불임 cybrid 양배추 육종 자원과 내병성(위황병, 뿌리혹병, 흑부병 등) 육종 기술을 접목하여 고순도 내병성 양배추 품종을 개발한다면 고부가가치 신품종 개발이 가능할 것으로 예상된다. 또한 개발된 옹성불임 자원은 다양한 계통을 육성하는데 지속적으로 활용되기 때문에 1회성 신품종 개발이 아닌 지속적으로 신품종을 개발하는데 활용될 수 있다. 따라서 추후 육종 기술을 이용하여 주요 병저항성, 환경 내재성, 고품질 계통들을 지속적으로 육성할 예정이다.

이를 위해 현재 확보된 신규 옹성불임 cybrid 양배추 식물체에 대한 특허 출원을 진행 중에 있으며, 향후 국제 특허까지 획득 할 예정이다. 또한 양배추 골든씨드 프로젝트 과제에 적극 활용하여 수출용 신품종 개발에 활용 하고자 한다. 보다 구체적으로는 1차적으로 중국 시장을 목표로 조생계 흑부병/위황병 저항성 품종개발에 본 연구의 신규 옹성불임 cybrid 양배추 육종 자원을 활용할 계획이며, 보다 많은 계통 육성을 통해 2차적으로 유럽/인도 등에 적합한 신품종 육성에도 활용할 계획이다. 그리고 골든씨드 프로젝트와 연계하여 기술이전을 통해 국내 연구자들이 본 과제의 결과물들을 활용할 수 있도록 하고, 이로 인해 국내 십자화과 육종 경쟁력 향상에 기여할 것임.

2. 십자화과 옹성불임 식물체 라인 활용계획(배추/유채/브로콜리)

배추/유채/브로콜리의 경우 본 과제를 통해 옹성불임 식물체까지 확인은 하지 못하였지만, 현재 분자마커로 검증된 cybrid 식물체가 생산되고 있는 단계이기 때문에 빠른 시일 내에 옹성불임 식물체가 확보될 수 있을 것으로 예상된다. 브로콜리의 경우 현재 원형질체 융합을 통해서도 식물체가 확보되고 있지만, 신규 옹성불임 cybrid 양배추와의 교배를 통한 옹성불임 브로콜리 육종 자원 생산이 가능하다. 따라서 신규 옹성불임 브로콜리 개발과 신품종 개발에 충분히 활용할 수 있을 것으로 예상된다. 또한 배추의 경우에는 아직까지 옹성불임을 이용한 상용화된 F₁ 종자가 없기 때문에 본 과제를 통해 확보 되는 옹성불임 배추 육종 자원을 최대한 신속히 품종 개발과 연계 시켜 고부가가치 품종 개발에 있어 경쟁 우위를 갖고자 한다. 배추 또한 골든씨드 프로젝트와 연계를 통해 중국/인도 수출용 신품종 개발에 적극 활용하고자 한다.

유채 전 세계 재배면적은 30,290천 ha('12년 FAO), 종자 시장 규모가 2조가 넘는 글로벌 작

물로 엄청난 잠재력을 가진 작물이나 국내 품종 개발 기술 수준은 매우 저조한 실정이다. 유채의 경우에는 옹성불임성을 이용하여 F₁ 종자를 생산하고자 할 시에 옹성불임 자원과 더불어 옹성불임을 회복시키는 회복친 개발이 추가적으로 필요하기 때문에 옹성불임 채종 시스템 개발이 전 세계적으로도 매우 어려운 실정이다. 즉 유채의 옹성불임 채종 시스템 개발에 대한 기술 가치는 매우 크나 높은 기술적 장벽을 갖는다고 할 수 있다. 본 연구에서는 분자마커로 검증된 신규 cybrid 유채 식물체를 생산하였고, 현재 전남대학교에서 차세대바이오그린 21과제로 DCGMS 옹성불임 회복 유전자 클로닝이 진행되고 있다. 따라서 향후 두 과제의 결과를 융합한다면 빠른 시일 내에 유채 옹성불임 채종 시스템을 완성하여 유채 품종 개발에 국제 경쟁력을 갖출 수 있을 것을 예상된다.

3 옹성불임 식물체 개발 기술 활용 계획

본 연구 개발에 사용되는 무 옹성불임자원(DCGMS)와 비대칭 융합기술을 이용한 중간교잡 식물체 생산기술의 개발은 독창적인 육종 시스템이므로 이를 십자화과 식물에 적용함으로써 독자적인 지적 재산을 확보하게 되고 종자 산업의 국가 경쟁력을 향상에 기여할 것이다. 또한 본 연구과제에서 확립된 비대칭 원형질체융합 기술은 십자화과 채소작물은 물론 현재 신 품종 종자 개발을 위해 다양한 연구가 진행되고 있는 식량작물이나 원예작물에도 쉽게 기술전이가 가능하여 작물 신 품종 개발 기술로서 효과적으로 응용이 가능할 것이다.

4. Cybrid callus 조기 식별 시스템

본 연구 개발에 사용된 Cybrid callus 조기 식별 시스템은 전통적인 원형질체 융합 기술과 분자마커의 접목으로 단기간 내에 원하는 형질의 옹성불임 자원을 개발 할 수 있는 기술로서, 본 연구 대상뿐만 아니라 다양한 대상의 원형질체 융합 기술에도 응용이 가능하다. 따라서 유사 연구를 진행 중인 국내 연구팀에게 실험 방법 및 기술 이전을 통해 타 연구의 효율화에 활용할 예정이다.

5. Cybrid 식물체 분석 및 세포질 융합 패턴 분석

본 연구를 통해 세포질 불활성화처리가 이루어진다 하더라도 개발된 식물체 라인별로 donor와 recipient 간의 세포질 유전자(엽록체 및 미토콘드리아)의 조합 패턴이 다양함을 알 수 있었다. 이 결과는 세포질 유전자의 혼합에 따라 유전자 수준에서 이들 사이에 상호 경쟁을 통한 특정한 유전자 패턴의 우점 기작이 존재함을 나타내는 것으로 세포질 유전자의 상호 경쟁 및 우점에 관련된 진화생물학적 연구 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

아울러 genomic DNAs 시료로부터 적외선분광 스펙트럼 분석을 통한 cybrid 식물체 식별체 계 및 십자화과 생물종 사이의 식별 패턴은 생물종 genome의 구조적 특성 분석은 물론 진화적 측면을 연구할 수 있는 새로운 단서를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

6. 특허 출원 계획 및 논문 게재 계획

본 연구 결과는 현재 특허 출원 명세서 작성 중에 있으며 대상 국가는 대한민국, 중국, 유럽 등으로 계획하고 있다. 또한 특허 출원 후 논문 게재를 할 예정이며, 옹성불임 유전자 및 신규 옹성불임 식물체의 특성 분석에 대한 논문을 게재할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

○ 원형질체 융합을 통한 이종간 잡종 식물체, cybrid 생산에 관한 기술 및 연구 개발 분야는 급진적인 기술개발이나 연구 환경 변화는 이루어지지 않지만 종자 회사 등에서 지속적으로 연구 개발이 이루어지고 있음.

○ 특히 십자화과 작물의 cybrid 개발 분야는 특이적인 연구 환경 변화가 없지만 이를 활용하고자 하는 종자 기업의 관심이 크게 증가하고 있음.

제 7 장 참고문헌

- Albert B, Godelle B, Gouyon PH (1998) Evolution of the plant mitochondrial genome: dynamics of duplication and deletion of sequences. *J. Mol. Evol.* 46:155–158
- Banyay M, Sarkar M, Gräslund A (2003) A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophys Chem* 104: 477–488
- Bellaoui M, Grelon M, Pelletier G, Budar F (1999) The restorer Rfo gene acts post-translationally on the stability of the *ORF138* Ogura CMS-associated protein in reproductive tissues of rapeseed cybrids. *Plant Mol. Biol.* 40: 893–902
- Brewer SH, Anthireya SJ, Lappi SE, Drapcho D L, Franzen S (2002) Detection of DNA Hybridization on Gold Surfaces by Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. *Langmuir* 18:4460–4464
- Chen, L., Carpita, N. C., Reiter, W. D., Wilson, R. H., Jeffries, C., & McCann, M. C. (1998). A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant J*, 16(3), 385–392
- Falk M, Hartman KA, Lord RC (1963) Hydration of deoxyribonucleic acid. III. A spectroscopic study of the effect of hydration on the structure of deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* 85:391–394
- Gonzalez-Ruiz V, Olives AI, Martin MA, Ribelles P, Ramos MT, Menendez JC (2011) An overview of analytical techniques employed to evidence drug-DNA interactions. Applications to the design of genosensors. In: *Biomedical engineering, trends, research and technologies*, M. A. Komorowska and S. Olszynska-Janus (eds.), InTech, pp 65–90
- Goodacre, R., Timmins, E. M., Burton, R., Kaderbhai, N., Woodward, A. M., Kell, D. B., & Rooney, P. J. (1998). Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology*, 144 (Pt 5), 1157–1170
- Grelon M, Budar F, Bonhomme S, Pelletier G (1994) Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile Brassica cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 243: 540–547
- Hashimoto, N., Noda, T., Kim, S. J., Sarker, M. Z., Yamauchi, H., Takigawa, S.,

- Matsuura-Endo, C., Suzuki, T., Han, K. H., & Fukushima, M. (2009). Yam contributes to improvement of glucose metabolism in rats. *Plant Foods Hum Nutr*, 64(3), 193–198
- Kim, S. W., Ban, S. H., Chung, H. J., Choi, D. W., Choi, P. S., Yoo, O. J., & Liu, J. R. (2004). Taxonomic discrimination of higher plants by pyrolysis mass spectrometry. *Plant Cell Rep*, 22(7), 519–522
- Kim S, Lim H, Park S, Cho K, Sung S, Oh D, Kim K (2007) Identification of a novel mitochondrial genome type and development of molecular makers for cytoplasm classification in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 115: 1137–145
- Kim, S. W., Min, S. R., Kim, J. H., Park, S. K., Kim, T. I., & Liu, J. R. (2009). Rapid discrimination of commercial strawberry cultivars using Fourier transform infrared spectroscopy data combined by multivariate analysis. *Plant Biotech Rep*, 3, 87–93
- Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG (2005) Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J Exp Bot* 56: 255–265
- Liquier J, Coffinier P, Firon M, Taillandier E (1991) Triple helical polynucleotidic structures: sugar conformations determined by FTIR spectroscopy. *J Biomol Struct Dyn* 9: 437–445
- Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rousselle P, Renard M (1983) Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 191: 244–250
- Stewart, D., Yahiaoui, N., McDougall, G. J., Myton, K., Marque, C., Boudet, A. M., & Haigh, J. (1997). Fourier-transform infrared and Raman spectroscopic evidence for the incorporation of cinnamaldehydes into the lignin of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants with reduced expression of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Planta*, 201(3), 311–318
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Wenning, M., Seiler, H., & Scherer, S. (2002). Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 68(10), 4717–4721
- Wold, H. (1966). Estimation of principal components and related models by iterative least squares. In: Krishnaiah, K. R. (Ed.), *Multivariate Analysis*, Academic Press, New, York, 391–420
- Zhou-Sun B, Sun J, Gryaznov SM, Liquier J, Garestier T, Helene C, Taillandier E (1997) A physico-chemical study of triple helix formation by an oligodeoxythymidylate with

N34'-P5' phosphoramidate linkages. Nucl Acids Res 25:1782-1787