

**무의 세포질웅성불임 특성 전이(轉移)에 의한  
십자화와 CMS 개발**

(Developments of a CMS system in Cruciferae by  
transferring a Cytoplasmic Male Sterility character  
present in radish.)

(주)농우바이오 생명공학연구소

농림수산식품자료실



0008932

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “무의 세포질융성불임 특성 전이에 의한 십자화과 CMS 개발”의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : (주)농우바이오

주관연구책임자 : 인 동 수

세부연구책임자 : 인 동 수

연 구 원 : 한지학, 이시우, 박영수

연 구 원 : 황도엽, 신종섭, 김남희

연 구 원 : 황희영, 장인창, 현지영

# 요 약 문

## I. 제 목 : 무의 세포질융성불임 특성 전이에 의한 십자화과 CMS 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

연구개발의 목표는 세포융합 기술을 이용하여 (주)농우바이오에서 개발한 세포융성불임(NWB CMS) 계통의 CMS 특성을 엽채류, 양채류 작물로 도입함으로써 십자화과의 육성 체계를 확립하여 새로운 CMS를 이용한 엽채류, 양채류의 중간모본을 확보함으로써 고품질 품종을 위한 인프라를 구축하고자 한다.

그동안 양채류의 채종에 이용되었던 융성불임 시스템을 (주) 농우바이오에서 무의 육종프로그램으로 독자적으로 개발하고 특허화 한 NWB CMS 시스템으로 전환하여 종자 채종에 안정적이고 특허권에 의해 보호 받는 (주)농우바이오 만의 양채류 육종 프로그램을 확보하여, 지적재산권을 확보하고자 한다. 독자적인 MS 육종프로그램은 종자 회사에서 가장 중요한 노하우이자 가치를 따질수 없는 유, 무형의 자산이다. NWB CMS는 현재 무의 육종시스템을 획기적으로 바꾸어 놓은 우수한 CMS계통이다. 십자화과 작물 즉 배추, 양배추, 브로콜리에서는 많은 경우 아직까지 독자적인 육종 프로그램 없이 비교적 MS 안정성이 낮은 Ogura CMS 등을 사용하고 있어 MS 특성이 안정한 육종프로그램의 보유에 대한 의지가 매우 높다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구팀은 원형질체융합(비대칭) 시스템을 이용하여 NWB CMS 형질을 배추, 양배추, 브로콜리에 도입하여 융합식물체를 개발하고자 한다. 또한 이미 확보하고 있는 NWB CMS의 DNA 마커 시스템을 이용하여 융합식물체내로 CMS 인자의 전이 여부를 검정 한 후, 융합식물체의 융성불임 여부를 확인하고 세대진전을 구축하고자 한다. 이런 과정을 통하여 NWB CMS 육종 시스템을 가진 독자적인 신품종을 개발할 수 있는 중간모본 최소 1종 이상을 개발한다.

## IV. 연구개발결과

### 1. 무, 배추, 양배추, 브로콜리 계통의 원형질체 배양 시스템 구축

- ▶ 식물체의 원형질체 효율적인 유리 조건과 양배추 원형질체 배양 시스템 확보

### 2. 비대칭 원형질체 융합 시스템 구축

- ▶ 무의 핵을 불활성화를 위한초원심분리기와 감마선 처리 조건과 양배추 세포질 불활성화를 위한 Iodoacetate 처리 조건을 확보하고, 최적의 융합조건 원형질 확보함.

### 3. 비대칭 원형질융합 시스템 확립

- ▶ 효율적인 PEG와 Electrofusion 방법을 이용한 원형질체 비대칭 융합 기술을 확보함.
- ▶ 이 시스템을 통하여 많은 세포 융합캘러스와 개체를 확보함.

### 4. 융합 식물체 CMS 형질 스크린

- ▶ 융합가능 기내 식물체를 대량 마커 검정 시스템을 이용하여 대량의 융합가능 캘러스와 개체를 선발함.
- ▶ 기존의 마커 검정을 현대적인 하여 업무효율도 높였다.

### 5. 융합 식물체 선발

- ▶ NWB CMS 마커 검증을 통한 캘러스로부터 식물체를 재분화 하여 개화를 확인함.
- ▶ 새로운 양배추 계통을 이용하여 보다 효율적인 재분화 시스템을 확보하고 NWB-CMS마커 검증을 통한 다량의 예비 세포융합 개체를 확보함.

### 6. 융합 식물체의 세대진전 후 MS 특성을 검정

- ▶ EF2, EF3 개체를 확보하여 개화에 성공하여 MS 형질을 확인하였고 이중 EF3에서 종자를 획득함. 이를 통하여 육종진전을 성공하였음. 안정적인 CMS 특성 재검증을 위한 시간이 필요함.
- ▶ 차후 새로운 라인으로 획득한 세포융합체의 개화여부를 관찰 예정임.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 본 과제의 결과물로 만들어진 NWB CMS 양배추 계통들 육성프로그램에 이용되어 우리나라 고유 품종임이 확인되는 양배추 품종화 사업에 이용되게 됨.
2. 교배육종을 통한 NWB CMS 전이도 가능하여 이를 통한 브로콜리와 컬리플라워로의 MS 특성 전이와 품종 개발에도 이용 됨.될 수 있다.
3. (주)농우바이오는 독자적인 양채류의 육성불임 육종 프로그램을 보유하게 됨.
4. 본 과제를 통하여 얻어진 (주)농우바이오에서는 비대칭 세포융합 기술 부분에서 국내에 독보적인 시스템을 구축과 노하우를 보유하게 됨.
5. 실험의 노하우 및 관련 계통은 NWB CMS 특성 전이의 최종적인 확인 후, 특허 출원을 위해 관련 데이터의 논문을 보유중으로 특허 문건 제출과 동시에 해외논문에 투고 할 예정임.
6. 본 과제를 통하여 확보한 식물 원형질체 비대칭 융합의 기술로 현재 양채류는 물론 산형과 및 가지과 등의 육종프로그램에 이용 중에 있음.

## SUMMARY

**Title: Developments of a CMS system in Cruciferae by transferring a Cytoplasmic Male Sterility character present in radish.**

The major purpose of this project is to develop a somatic hybrid, asymmetric protoplast fusion was carried out by conjugating the nucleus of cabbage and the cytoplasm of radish through an electro-fusion or chemical-fusion methods.

1. Radish, cabbage, chinese cabbage Protoplast Isolation system and culture systems were conformed.
2. Protoplasts of the cabbage were treated with iodoacetate to make the cytoplasm inactive, and the protoplasts of the radish were irradiated with gamma ray to kill the nucleus activity but save the organelle components.
3. Asymmetric Electro and chemical protoplast Fusion system conformed between Cabbage and Radish.
4. Putative hybrids calli were screened by high-throughput analysis using NWB-CMS specific marker to identify callus that contained the CMS gene. than putative fused callus were regenerated.
5. One hybrid plant (EF3) showed a phenotype very close to cabbage. When this hybrid was flowered, male sterility was observed. We made a back-cross it to parental male fertile cabbage and other cabbage lines. The seeds were obtained, and these will be analyzed for the sterility.
6. Recently, 50 putative hybrids were constructed using other cabbage lines and these hybrids contained the NWB-CMS gene.

# CONTENTS

Part I. Introduction of Research Project .....	8-10
Chapter 1. Research Objective .....	8
Chapter 2. Research Necessity .....	8
Chapter 3. Research Scope .....	10
Part II. Present View of Technology in Domestic and Foreign Countries .....	11-14
Chapter 1. Present View of Technology in Foreign Countries .....	11
Chapter 2. Present View of Technology in Korea .....	11-12
Chapter 3. Present View of Technology in Nongwoo Bio. Co. lid .....	12-14
Part III. Results of Research Program .....	15-71
Chapter 1. Materials and Methods .....	15-18
Chapter 2. Establishment of Brassica species protoplast culture systems .....	19-28
Chapter 3. Establishment of asymmetric protoplast fusion systems .....	29-35
Chapter 4. Using of asymmetric protoplast fusion systems .....	36
Chapter 5. Screening of CMS character of fusion calli and plantlets .....	37-46
Chapter 6. Selection of CMS character of fusion plants .....	47-51
Chapter 7. Confirm of CMS character of fusion plants at next generation .....	52-71
Part IV. Achievement and Contribution Levels of Results .....	72-73
Chapter 1. Achievement Levels of Results .....	72
Chapter 2. Contribution Levels of Results .....	73
Part V. Future Plan and Application of Results .....	74-75
Part VI. Scientific and Technological Information Collection from Foreign Country	

.....	76
Part VII. Reference .....	77

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	8-10
1절. 연구개발의 목적 .....	8
2절. 연구 개발의 필요성 .....	8
2절. 연구 개발의 범위 .....	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	11-14
1절. 세계적 수준 .....	11
2절. 국내 수준 .....	11-12
3절. (주)농우바이오의 연구현황 .....	12-14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	15-71
1절. 실험 재료 및 방법 .....	15-18
2절. 무, 배추, 양배추, 브로콜리 계통의 원형질체 배양 시스템 구축 .....	19-28
3절. 비대칭 원형질융합 시스템 구축 .....	29-35
4절. 비대칭 원형질체 융합 시스템 이용 .....	36
5절. 융합 식물체 CMS 형질 스크린 .....	37-46
6절. 융합 식물체 선발 .....	47-51
7절. 융합 식물체의 세대진전 후 MS 특성을 검정 .....	52-71
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	72-73
1절. 목표 달성도 .....	72
2절. 관련분야의 기술발전 기여도 .....	73
제 5 장 연구개발성과 및 성과 활용계획 .....	74-75
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	76
제 7 장 참고문헌 .....	77



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절. 연구개발의 목적

원형질체융합(비대칭) 시스템을 이용하여 NWB CMS 형질을 배추, 양배추, 브로콜리에 도입하여 융합 식물체를 개발하고자 한다. 또한 이미 확보하고 있는 NWB CMS의 DNA 마커 시스템을 이용하여 융합식물체내로 CMS 인자의 전이 여부를 검정 한 후, 융합식물체의 음성불임 여부를 확인하고 세대진진을 구축하고자 한다. 이런 과정을 통하여 NWB CMS 육종 시스템을 가진 독자적인 신품종을 개발할 수 있는 중간모본 최소 1종 이상을 개발하고자 한다.

## 2절. 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

- ▶ 최근의 종자산업은 단순히 농업 혹은 제조업의 한 부분이 아니고 최첨단 생명공학의 기술을 이용한 바이오산업으로 새롭게 인식되고 있다. 21세기 종자 산업은 부가가치적인 차원에서 웬만한 전자 제품보다 높을 정도로 유망한 미래사업인 것이다. 종자 산업 가치의 창출은 고유하게 개발한 유전자원과 다양한 육종기술들을 통하여 얻어지는데 이 중에서 음성불임은 가장 중요한 F<sub>1</sub> 육종 시스템의 하나로 종자의 순도 및 생산가격 등의 형성에 가장 기여도가 큰 기술이다. 2006년도 예상 국내 채소류 종자 시장의 규모는 약 1200 억원이며 이중 십자화과 작물은 360억 원 정도로 약 29%를 차지하는 비중 있는 시장이다. 무 시장이 225억, 배추가 113억 정도이며 기타 양배추, 브로콜리 등이 나머지를 차지하고 있다. 대부분의 십자화과 작물에 대한 육종체계나 종자개발 기술이 CMS를 기본으로 발전하고 있는 것이 현 실정이어서 종자의 매출은 CMS 같은 좋은 육종기술 여하에 달려있다고 볼 수 있다.
- ▶ 세계적으로도 십자화과 관련 배추는 중국 시장과 동남아 시장을 구축하기 위해서 신품종 육성에 중점을 두고 있다. 양채류의 주요 작물인 양배추, 브로콜리, 컬리플라워의 종자시장 규모는 약 2억불(각 6천, 7천, 7천만불)로서 매우 크고 우수 품종이 많아서 각 다국적 기업마다 고유품종으로 판매경쟁이 매우 심각하다. 현재 (주)농우바이오는 미국, 중국, 유럽까지 수출 다변화를 위하여 기초 육종 체계를 구축하였으며 신품종을 개발하여 세계 시장에 입문하려는 단계에 있다.
- ▶ 현재의 국내 종자 산업은 지난 IMF 시기의 국내 유수의 종자 회사의 다국적 기업으로의 매각으로 인하여 막대한 유전자원의 유출을 경험하였고 아울러 우리나라 종자 시장마저 다국적 종자기업의 경영 방침에 따라 좌우되는 상황에 이르렀다. 반면에 (주)농우바이오는 국민과 농민의 이익을 먼저 생각하는 국내 토착 기업으로서 지난 7년간 매년 총 매출액의 15%를 연구비로 투자하여 우수품종 개발에 중점을 두어왔다. 특히 1999년 생명공학연구

소를 세우고 우수 계통과 품종 개발을 위한 기초 인프라 구축을 확립하여 DNA 분자마커를 이용한 육종체계, 약배양을 비롯하여 유전자원 생산, 자체병리연구를 통한 내병성 육종, 고추형질전환을 비롯한 차세대 형질전환작물 개발시스템 구축을 통해서 국내의 유일한 농업생명공학회사로 탈바꿈하였다. 그동안 성공적인 업적 여러 개 중 하나가 무의 CMS 특성을 갖는 계통 확보 및 그의 분자마커 개발이다.

- ▶ CMS는 체세포웅성불임(cytoplasmic male sterility)이라는 육종기술로서 화분, 꽃밥, 수술 등의 웅성 기관에 이상이 생겨 불임이 유도함으로서 자가 수정 능력을 갖지 못하는 현상을 말한다. 세포질 요인에 의해 미토콘드리아가 정상적인 기능을 수행하지 못해서 비정상적인 생식기능이 생성되는데 CMS는 모계유전(maternal inheritance)으로, 웅성 불임계의 유지가 매우 쉽고, 잎, 줄기 등 영양기관을 이용하는 작물에 적용하기가 매우 편리하다. 웅성불임 현상을 이용하여 종자의 채종과 생산체계를 확립하는 것이 CMS를 이용하는 가장 큰 목적이며 이런 특성을 가진 계통을 많이 만들어 낸다는 것이 육종가들의 꿈이다. 이러한 이유로, F<sub>1</sub> 종자 생산에 CMS를 이용하려는 시도가 계속 되고 있으며, 이를 위해 많은 식물체의 CMS에 대한 연구가 진행되었다.
- ▶ 특히 세계의 유명한 다국적 종자회사들이 CMS 기술을 이용하여 십자화과 작물의 육종체계를 발달시키고자 하였는데 십자화과 작물은 1990년도까지 갖과 무를 제외하고는 웅성불임이 확인되지 않아 채종에 이용하기에는 많은 제한요인이 있었다. 이후 여러 CMS 체계가 발견되어 이용되고 있으며, 현재 Ogura CMS 계통을 이용한 잡종종자 생산이 제일 많이 수행되고 있다. 그러나 Ogura CMS를 교배모본으로 이용한 경우, 일부 육종 계통에서는 CMS의 도입여부가 현저하게 차이가 나는 것으로 알려져서 Ogura CMS 계통을 이용한 F<sub>1</sub> 잡종 종자 생산은 한계가 있다고 지적되었다. 또한 국내 육종회사의 큰 문제점 중 하나는 이들 CMS 관련 특허가 모두 외국기업에 있다는 것이다. 따라서 이를 이용하게 되면 종자회사의 입장에서 기술 도입료의 부담을 받게 되고 이는 종자 생산 단가에도 영향을 미쳐 국제 경쟁력이 있는 종자개발 자체가 쉽지 않은 상황이다.
- ▶ 이에 (주)농우바이오에서는 2000년서부터 독자적 CMS 시스템의 확보를 위해 연구를 수행하였다. 이후 2003년도에 드디어 무에서 NWB CMS를 개발하게 되었고 NWB CMS 판별용 분자마커를 발명하여 NWB-CMS 계통과 함께 특허 출원하고 등록되었다(특허 list 참조). 이는 지금까지 사용되는 외국에서 주로 이용되는 CMS와는 차별화되는 독자적 시스템으로 Ogura CMS 계열보다 세대간에도 안정적이고, 환경적 영향에 의한 CMS 형질의 불안정화 현상도 적어 F<sub>1</sub> 종자 생산에 큰 장점을 가지고 있다. 실험적으로 Ogura CMS 무 계통을 교배모본으로 이용한 경우에는 16종류의 육종 계통 중에서 약 50% 정도에서만 웅성 불임 계통이 나왔으며, 또한 Ogura CMS 무 계통의 CMS 도입여부가 계통별로 현저히 차이남을 확인할 수 있었다. 반면에, (주)농우바이오에서 개발한 NWB CMS 무 계통을 교배모본으로 이용한 경우에는 16종류의 모든 육종 계통에서 웅성 불임 계통이 나옴을 확인하였고 교배실험에서도 100% 웅성 불임 계통이 나옴을 확인하여 NWB-CMS의 웅성 불임성 도입률이 종래 Ogura-CMS 무 계통보다 월등히 우수하다는 것을 확인할 수 있었다(2005년 발표논문). 따라서 현재 무 육성은 전부 NWB CMS를 기반으로 하고 있으며 지난 수년간 괄목만한 우수 품종 개발이 진행되어 왔다.
- ▶ 독자 개발된 고유의 NWB-CMS 특성을 양배추, 배추, 브로콜리, 컬리플라워 등으로 전이할 수 있으면 한국 고유의 NWB-CMS를 이용한 저비용, 고순도의 우수 F<sub>1</sub> 종자 생산으로 외국 기업과의 경쟁에서 비교우위를 점할 수 있을 것이다. 또한 국내 종자산업의 독립적 기술력을 특허화 하여 다국적 기업

의 특허시비를 무시할 수 있으며, 나아가 국제 시장 유통에서 이미 확보된 분자마커를 이용하여 국내외적으로 문제시 되는 우수 F<sub>1</sub> 종자의 copy 문제 및 유전자원 유출과 지적재산권을 효율적으로 통제할 수 있어서 NWB-CMS 특성의 십자화과 작물은 세계적으로 독점화할 수 있다.

- ▶ 무의 NWB-CMS 특성 기술을 다른 십자화과 작물에 전이할 수가 있다면 (주)농우바이오가 기술적으로 세계적인 종자회사로 성장할 수 있는 기반을 제공함과 동시에 국제 십자화과 F<sub>1</sub> 종자 시장에서 경제적으로 엄청난 매출을 확보할 수 있는 근거를 마련할 수 있다. 즉 국가 경쟁력을 높일 수 있는 중요한 육종 시스템을 확보하는 계기가 될 것이다.

### 3절. 연구개발의 범위

#### 1. 연도별 진행

##### 가. 1차년도 (2006)

- (1) 무, 배추, 양배추, 브로콜리 등 순계 원형질체 배양 시스템 확립
- (2) PEG, Electro-fusion 에 의한 원형질 융합 시스템 확립

##### 나. 2차년도 (2007)

- (1) 화학적 물리적 비대칭 원형질 융합시스템 확립
- (2) CMS 분자마커를 이용하여 PCR 분석을 통한 기내 식물체 스크린

##### 다. 3차년도 (2008)

- (1) 작물별 융합 식물체의 확보
- (2) 각 작물별 특성 검정 및 세대진전

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	V	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- ▶ 옹성불임을 이용한 품종의 개발은 외국에서 이미 정립된 육종기술이다. 외국의 CMS는 현재까지 애기장대, 사탕무, 옥수수 밀, 호밀, 해바라기 등에서 광범하게 발견되었으며, 육종적인 측면에서 중요한 십자화과 식물에서는 Polima, Napus, Ogura, Anand CMS가 잘 알려져 있다. 이중 *Brassica*속에서는 *Raphanus*속에서 전이한 Ogura와 Kosena CMS가 육종에 이용되고 있다(L'Homme and Brown 1993, Handa et al. 1995, Singh et al. 1996, Cardi and Earle 1997). 이중 Ogura-CMS는 무속(屬) 식물로부터 유래되어 가장 육종적으로 이용이 많이 되는 시스템 중 하나이다. 이 Ogura-CMS를 이용하여 미국의 코넬 대학에서 원형질체 융합으로 Ogura 세포질 옹성불임 형질을 가진 양배추를 1985년에 육성하였고, 유채는 Jourdan 등이 1989년에 만들었으며, 이 유채의 옹성불임성을 배추에 옮겨서 CMS 배추를 만드는 등 이후 많은 십자화과 식물의 육종에 이용되어 왔다. 선진국의 다국적 종자회사에서는 현재까지도 지속적으로 옹성 불임의 개발 및 개량에 힘쓰고 있고, 나아가 CMS의 기작을 밝히거나 원천적으로 형질전환으로 유도된 CMS 개발하고 있으며 최근에는 화학물질을 이용하여 옹성불임을 조절하는 단계에 이르고 있다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Cornell university	원형질융합을 Ogura CMS를 이용한 양배추 육성	원형질 융합을 통한 CMS 전이를 통한 십자화과 작물 계통 이용중
막스프랑크 연구소	비대칭 원형질체 융합을 통한 작물의 형질 개량	미세 원형질 융합을 이용한 단일 세포의 비대칭 원형질 융합 시스템 개발
DNA PLANT TECH-NOLOGY Corporation	비대칭 원형질 융합을 통한 CMS 작물 개발 기술	CMS 이용 기술 개발
University of Guelph	옹성 불임과 제초제 저항성을 이용한 원형질 융합 시스템 개발	유채에서 옹성불임을 이용한 효율적인 원형질 융합 개체 선발함

### 2절. 국내수준

개념정립 단계		기업화 단계		기술 안정화 단계	V
---------	--	--------	--	-----------	---

#### 1. 국내의 십자화과 식물의 육종

- ▶ 우리나라는 역사적으로는 우장춘 박사가 U's triangle이라는 유명한 십자화과 식물 계통의 진화이론 등 전통적으로 세계 최고 수준의 고전 육종학적 연구 바탕을 가지고 있었다. 이후 1970년대부터 배추를 시작으로, 80년도 초반부터는 무를 중심으로 우수한 품종이 개발

되었고, 90년대 후반부터는 국내는 물론 세계시장에 수출 목적으로 현지의 기후와 취향에 맞는 맞춤형 품종개발을 수행하는 단계에 이르렀다.

## 2. 원형질 융합을 통한 작물의 개량

- ▶ 십자화과의 원형질체 융합 시도는 유채에서 대구 카톨릭 대학의 유순남 교수가 초원심분리를 이용한 비대칭 원형질 융합을 통하여 CMS 유채를 이용한 품종 개발 시도하였고, 강원대 입학대 교수가 갖의 CMS를 십자화과에 옮기는 시도가 있었다. 그리고 농촌진흥청 김호일 박사가 양배추의 응성불임주를 원형질 융합에 이용하는 등 90년 초부터 2000년도 초반까지 각기 제한적인 영역에서 실험이 이루어져 왔으며, 이외에 야생형 감자, 당근과 인삼 등의 원형질 융합이 수행된 바가 있고, 현재 감귤의 신품종 육성 등에 이용되고 있다. 전체적으로 기술적 측면에서는 크게 외국과의 차이점은 없으나 지속적인 연구 및 관련 노하우에 대한 축적이 미약하고 본 기술이용에 대한 목적의식이 약해서 커다란 진전이 없었다.

## 3. 십자화과의 응성 불임을 이용한 품종 육성

- ▶ 최근 육종적으로 Ogura-CMS를 이용하여 국내 종자회사에서 몇 년 동안 배추를 CMS로 만들려는 노력들이 있었으나 근본적으로 풀샘 기능이 약하고 저온일 때 속잎이 황화현상을 나타내어 생장이 더디고 불충분하여 연구를 중단하였다. 따라서 현재 새로운 CMS 육종체계의 개발 연구는 거의 전무한 상태이며, 이미 알려진 CMS 계열의 전이를 통한 품종 개발 역시 미약한 실정이다. 다만 또 다른 모종자회사에서 CGMS 응성불임성 계통과 유지친을 육성하여 유채 F<sub>1</sub> 작물개발에 이용하고 있는 것으로 알려지고 있다. 현재까지 대부분의 국내 종자회사는 자가 불화합성을 이용한 품종 개발과 아울러 일부 외국의 CMS 시스템을 차용한 연구만 하고 있다. 이미 알려진 Ogura-CMS 등 외국기술을 이용한 시판용 1대 잡종을 만들면 판매금액 또는 이익금의 일정비율을 로열티로 지불해야하기 때문에 우리 고유의 응성불임성 계통을 육성할 필요가 있는 것이다. 현재 국내에서 독립적인 CMS 시스템의 개발에 대한 가시적인 성과는 (주)농우바이오의 무 NWB-CMS가 유일한 실정이며 NWB-CMS는 독보적이며 매우 높은 경쟁력을 가지고 있는 기술이다. 최근 (주)동부하이텍에서 독자적인 무의 CMS 시스템을 특허 등록하고 십자화과에 전이하고자 노력중이다.

## 3절. (주)농우바이오의 연구현황

2004년부터 본 연구팀은 NWB CMS 형질의 무와 양배추의 원형질체를 분리, 배양하는 방법을 구축하였으며 원형질체에서 shoot을 재분화시키는 조건도 확보하였다. 이어서 PEG를 사용하여 두 원형질체의 융합을 시도하였는데 다음과 같은 연구 결과를 확보하고 있다.

### ▶ 실험 재료

HNA line (hypocotyls) of *Brassica oleracea*(양배추)와 NWB-CMS line (leaf) of *Raphanus sativus*(무)

### ▶ 실험 방법 (순서)

1. Protoplast isolation
2. Protoplast fusion: PEG method (poly ethylene glycol M.W.8000, 25%, 10 min)
  - symmetric fusion
3. Fused protoplast culture:
  - Modified MS liquid medium + 2% glucose+ 7%mannitol
  - + BA 1 / NAA 1 / 2,4-D 0.25 (mg/l) 4weeks
  - Micro-calli transferred to MS semi-solid medium+ kinetin2/2,4-D0.5 (mg/l)
4. Shoot induction: MS+ zeatin2/GA 0.035 (mg/l)+ agar1.6%
5. PCR and RAPD analysis: Use of NWB-CMS marker and UBC primers to confirm the authenticity of fused protoplast.

▶ 실험 결과

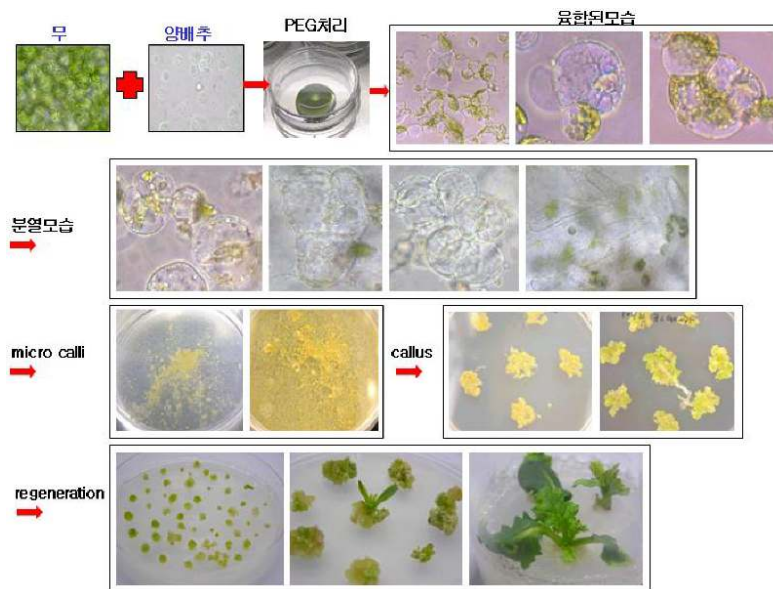


그림 1. NWB CMS 형질의 무와 양배추에서 원형질체를 분리하고 PEG 원형질 융합이 진행된 식물체의 재분화 과정 .

약 2천여 점의 무와 양배추 종자를 발아시켜서 원형질체 분리를 위한 재료로 사용하였으며 NWB-CMS 형질의 무와 양배추에서 원형질체를 분리한 다음 대칭융합을 얻기 위하여 PEG를 이용한 원형질 융합을 시도하였다. 또한 원형질체로부터 재분화 되는 방법과 그 과정을 구축하였다(그림 1). 총 24개의 융합체를 발견하였으며 모두 shoots로 분화시키는데 성공하였다. 흥미로운 발견은 이들 융합체들이 원예적으로 무보다는 양배추에 많이 근접되어 있었다(그림 2).

-이들이 세포질융합체인지를 확인하기 위해서 NWB CMS 특이 분자마커를 이용하여 PCR 분석을 하였으나 NWB CMS 특성을 발견하지 못하였다. 그러나 무 특이 마커를 이용하여 분석한 결과 이중에서 3개체는 이중간의 핵이 융합된 것으로 판명되었다. 따라서 대칭융합으로 시도된 NWB-CMS 전이는 세포질융합이 아니고 핵융합만 성공하였다.

현재 핵의 융합체까지는 확보하였기에 PEG를 이용한 세포질 융합까지의 시스템의 구축은 일부 확보하였으며 이에 본 연구팀의 목표인 비대칭 세포질융합관련 기술의 축적이 필요할 것으로 사려 된다.

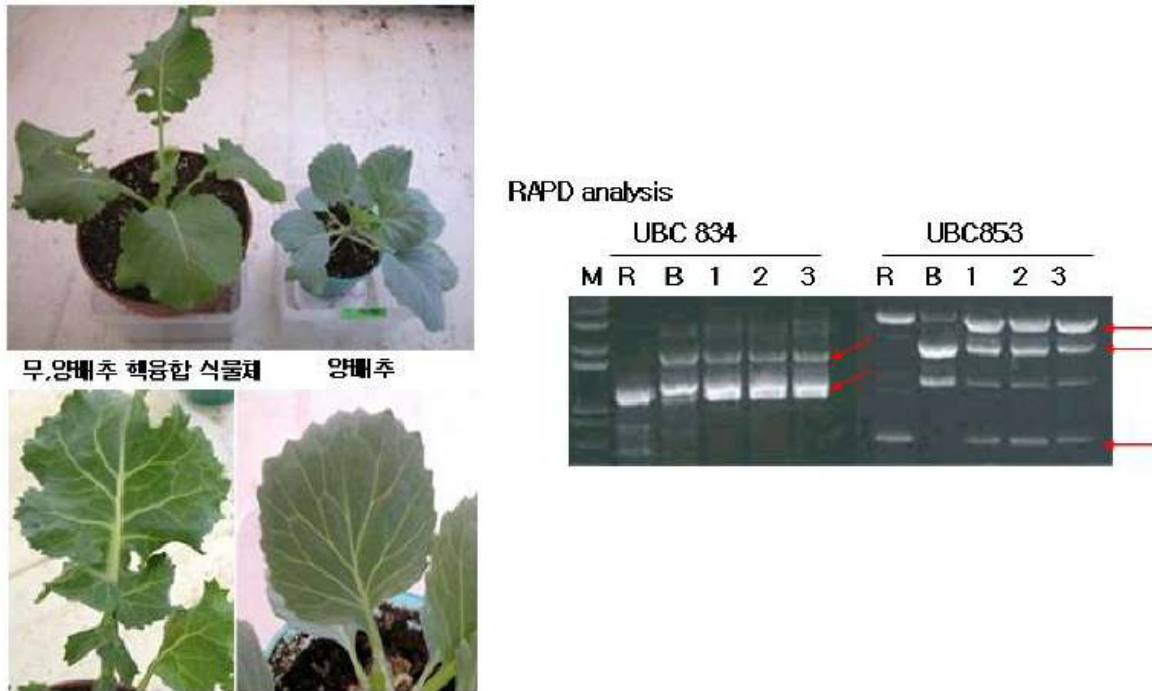


그림 2. 원형질 융합체의 형태적 비교 및 핵 융합관련 RAPD PCR 사진.

▶ (주)농우바이오 NWB-CMS 관련 특허

1. 새로운 유전자형의 CMS 무 계통의 식물체, 이를 이용하여 잡종종자를 생산하는 방법 및 상기 NWB-CMS 무 계통의 식물체 선발용 DNA 표지인자.

Korean Patent 10-0399333 (2003. 9. 15)

2. Callus and plant of a novel genotype of CMS

Japan Patent Application Japan/2003-300909 (2003. 8. 26.)

3. Callus of *Raphanus sativus* line with a novel genotype of CMS and method for producing a plant and a hybrid seed using the same.

China Patent Application China/03155556.X (2003. 8. 28)

▶ NWB-CMS 관련 논문

Nahm SH, Lee HJ, Lee SW, Joo GY, Harn CH, Yang SG, Min BW (2005) Development of a molecular marker specific to a novel CMS line in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theo Appl Genet* 111: 1191-1200

### 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1절. 실험 재료 및 방법

본과제의 핵심적인 내용은 국내에서 정립되어 있지 않은 비대칭 융합을 시스템화하여 (주)농우바이오가 보유한 NWB CMS 형질을 양채류로 전이하는 것이다. 이의 실험적인 접근은 무의 핵을 효율적으로 불활성화하고 양채류의 원형질체의 세포질의 유전물질중 하나인 미토콘드리아의 계놈을 억제하여 원형질 융합을 통하여 서로 상보적인 유전물질의 치환을 수행하는 하여 마커 검증을 통해 융합체 선발을 수행하였으며 개화를 통해 최종적으로 종자를 얻었다 (그림 3, 4).

#### 1. 식물재료

Radish: NWB-CMS line 서호골드 F1  
Cabbage: inbreed line C564, AD Bantam  
Chinese cabbage: inbreed line #42

#### 2. 실험방법

##### 가. 원형질체 분리 효소

Viscozyme L, (Novozyme Co. Ltd.)  
Celluclast 1.5FG L, (Novozyme Co. Ltd.)  
Pectinex 5XL (Novozyme Co. Ltd.)

##### 나. 양배추& 배추 원형질체 배양

배지: IC (MS+NLN vitamins+BAP+2,4-D)  
CP (MS+B5 vitamins+Kinetin+2,4-D)  
SR (MS+B5 vitamins+BAP)

배양조건: 초기배양 : 3주

캘러스 증식: 2-3 주

재분화 : 4 주

원형질체 배양밀도:  $2 \times 10^5$ /ml

##### 다. 융합 전 원형질체 전처리

양배추: 3mM IOA for 10 min.

무: 0.3 ~ 0.5 kGy  $\gamma$  -ray



라. 전기적 융합 조건

장치: Electro Cell Manipulator Model  
2001 by BTX, Inc.(San Diego,CA)  
버퍼: 0.5M mannitol, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5.8  
미세조건 - alignment (40-80V/cm, 20-40 sec.)  
- pulse (1250V/cm, 60 μsec.)  
융합밀도: 약 2 X 10<sup>5</sup>/ml

마. 화학적 융합 조건

버퍼: 25% polyethylene glycol 8000, 0.1M  
glucose, 20mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.7M  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.8  
처리방법 - 1:1 의 부피로 원형질체 혼합  
- 10 분간 원형질체 침강  
- 10분간 PEG 처리  
- W5 용액으로 세척  
- 배양배지로 배양실시  
융합밀도: 약 5 x 10<sup>5</sup>/500ul

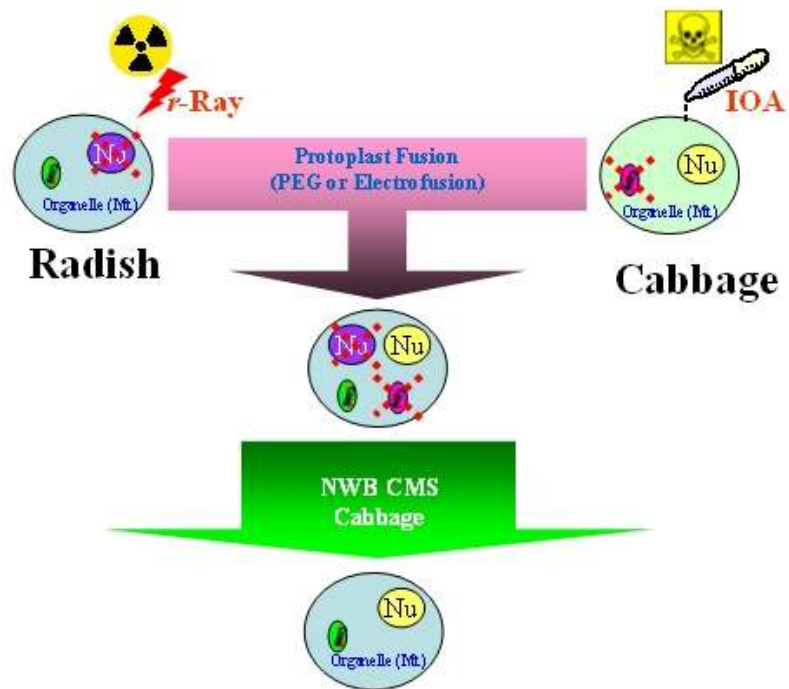


그림 3. 무와 양배추의 원형질 융합 개념도

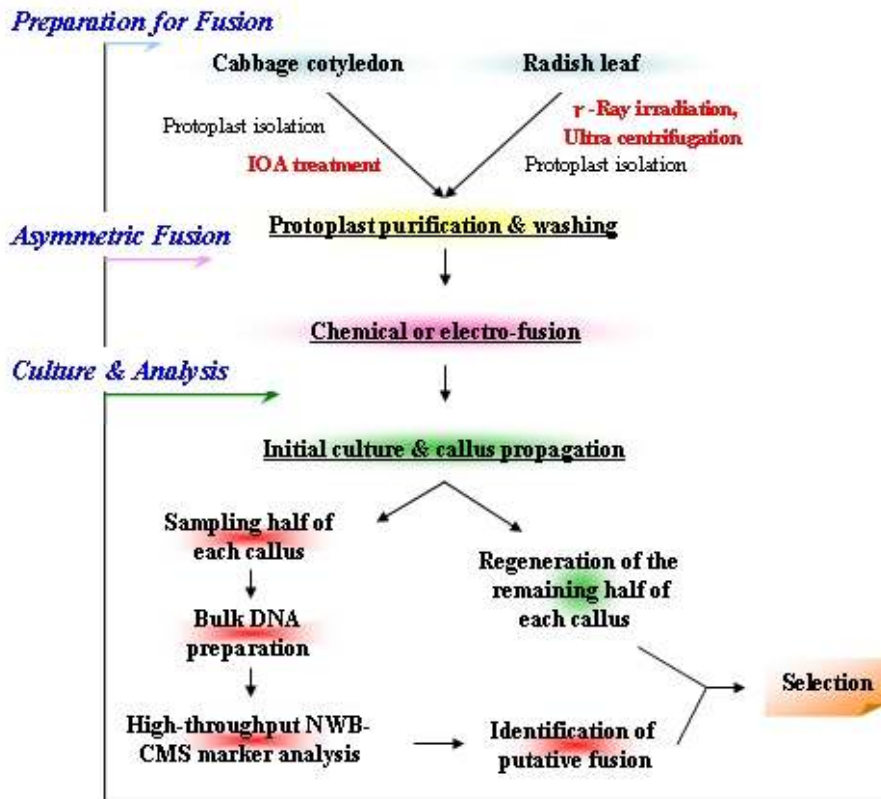


그림 4. 양배추와 무의 비대칭 원형질체 융합 시스템

## 2절. 무, 배추, 양배추, 브로콜리 계통의 원형질체 배양 시스템 구축

### 1. 식물체의 원형질체 유리정도를 확인

#### ○ 원형질체 배양 모식물체의 NWB CMS 마커 검정

실험에 들어가기 전에 현재 (주)농우바이오에서 보유하고 실험에 사용할 종자의 NWB CMS 특성의 안정정도를 측정하기 위해 실험재료 종자를 각기 무균 받아서 마커 검정을 실시한 결과 무에서 정확히 NWB CMS마커가 확인되었다. 아울러 양배추와 배추의 경우에는 마커 확인이 안됨을 확인하여 일차적으로 실험에 사용될 재료의 순수성과 NWB CMS 특성을 가지고 있음을 유추할 수 있었다 (그림5).

#### ○ 원형질체 배양에 중요한 고효율의 원형질체 유리 시스템 확립

대량 원형질 분리 조건을 확립하여 원형질 분리를 하기 위해서 전처리가 매우 중요함을 확인하였다 TVL용액을 이용하여 약 1시간정도의 전처리가 원형질체의 유리를 매우 촉진하게 되며 효소의 작용도 빨라짐을 확인하였다. 또한 고가의 효소를 대체할 산업용 효소를 찾아 원형질체 배양에서 가장 고가인 효소의 단가를 혁신적으로 낮추었다. 최적의 Enzyme 조성은 Viscozyme : Cellclast : Pectinex를 1 : 0.5 : 0.5의 비율로, 이를 이용하여 식물자엽에서 원형질체의 유리정도가 1g 당  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$ 개 정도가 됨을 확인하였다(그림 6, 7).

### 2. 핵의 공여자인 십자화과 작물의 원형질체 배양시스템을 확인

#### ○ 양배추의 원형질체 시스템 스크린

유리된 양배추 원형질체를 이용하여 각 호르몬 조성별 콜로니 및 캘러스의 형성률을 확인하여 MS + BD와 MS + BND I 조합이 우수함을 확인하였다. 이중 캘러스의 재분화율이 좋은 MS + BD를 실험에 주로 사용하였다 (표 1). 또한 초기 배양 시기별로 캘러스 발생 정도를 측정한 결과 3주차에 효율이 좋은 것으로 확인하였다(표 2). 기타 광조건(표 3)과 MS 배지의 암모늄이온의 제거 여부에 따른 캘로스 유기 정도도 확인하였고(표 4), 캘로스의 재분화 조건을 호르몬 별로 탐색하여 신초의 유기율이 BAP 1mg/L 가 첨가된 MS 배지에서 가장 양호하였다 (데이터 미 첨부). 이를 통하여 최적 배양조건을 확보하였다(그림 8).



그림 5. 세포융합에 사용할 모식물체 종자의 각각의 NWB CMS 마커 검정.

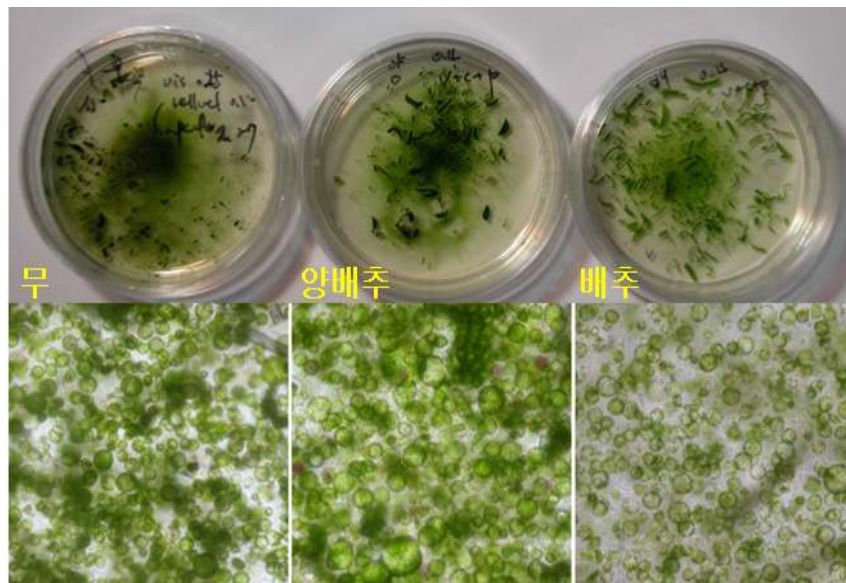


그림 6. 무, 양배추, 배추 자엽으로부터의 원형질체 유리

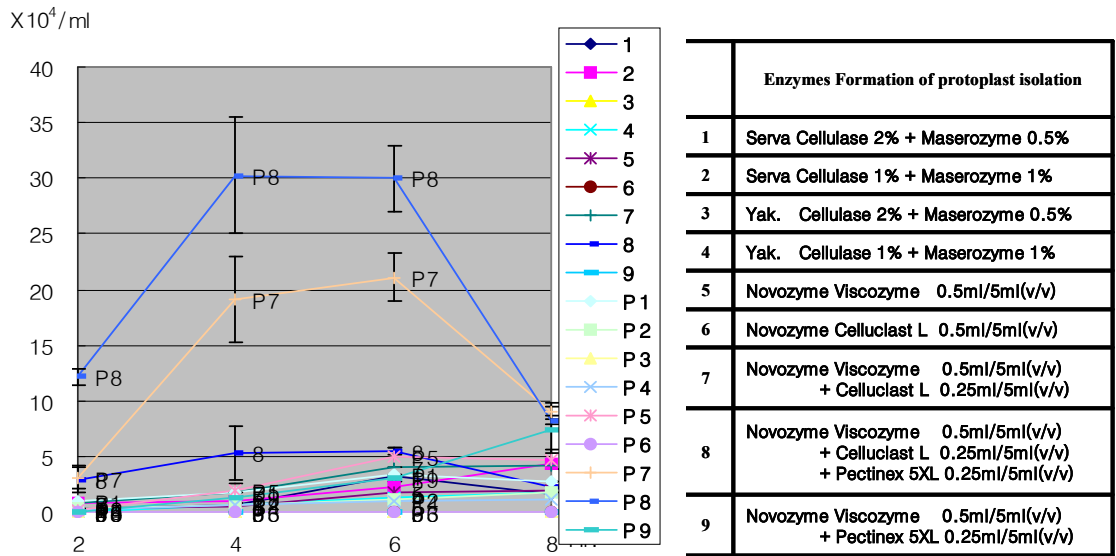


그림 7. 서로 다른 효소 조합에서의 양배추 자엽의 시간별 원형질체 유리정도.

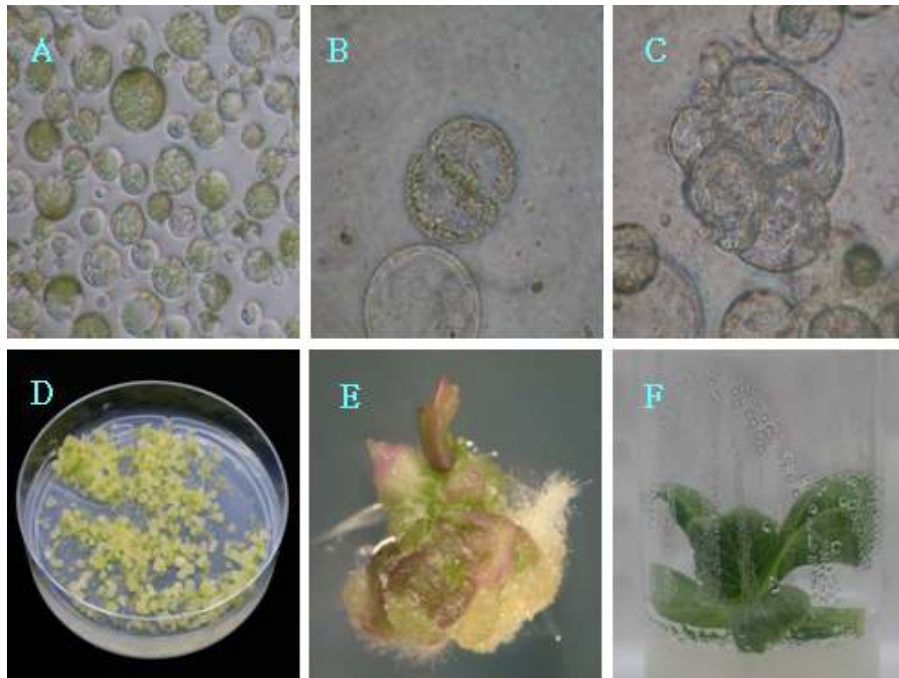


그림 8. A: 양배추 자엽유래 원형질체, B,C: 초기 원형질체 분열,  
 D: 배양 38일차의 초기 미소괴, E: 배양 50일째의 신초 형성,  
 F: 원형질체 유래 양배추 재분화체.



표 1. 호르몬의 조합에 따른 양배추의 원형질체 배양에서의 콜로니와 캘러스의 유기 정도

Initial culture medium	Colony formation	Callus formation <sup>a</sup>
MS + BD	+++	+++
MS + BN	-	-
MS + BND I	+++	+++
MS + BND II	++	+
MS + BND III	++	+
MS + BNDK	-	-
MS + NDK I	++	+
MS + NDK II	+++	+
MS + NK	+	-

<sup>a</sup>: callus propagation medium based on the MS medium supplemented with 5 mg/l Kinetin and 0.5 mg/l 2,4-D

표 2. 초기 양배추 원형질체 배양시기별 캘러스 형성률

Period of initial culture (weeks)	Callus formation <sup>a</sup>	
	MS + BNDI	MS + BD
2	+++	+
3	+	++++
4	-	-

a: callus propagation medium based on the MS medium supplemented with 5 mg/l Kinetin and 0.5 mg/l 2,4-D

표3. 초기 캘러스 배양에서의 광조건의 변화에 따른 캘러스 유도정도

Light conditions	No. of calli
D3a	55±2
D1L2b	60±20
D2L1c	317±12

a: 3 weeks in the dark

b: 1 week dark + 2 weeks light

c: 2 weeks dark + 1 week light

표 4. 초기 배양 배지의  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  유무에 따른 캘러스 획득 정도.

Medium	No. of calli
Control	$317 \pm 12$
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ free	$1453 \pm 158.5$

### 3. 배추, 브로콜리, 컬리플라워의 원형질체 시스템 스크린

배추의 원형질체 배양 역시 양배추의 배양시스템에 준하여 확인하였고 초기 배양이 진행되어 캘로스의 유기가 완료된 상황이며 신초 유기단계를 스크린을 수행하였다. 스크린 결과 배추의 재분화가 매우 어렵고 기존의 호르몬 결과와 마찬가지로 단순한 호르몬의 조합을 통해서는 신초의 유기가 결과워 최적의 신초 유기 및 개체화를 위해서는 대규모의 조직배양 환경 스크린이 필요함을 확인하였다 (데이터 미제시). 따라서 실험의 규모와 연구원의 집중도를 높이고 2차년도 과제 심사 위원들의 견해로 양배추의 대량 세포융합체의 확보를 위해 실험을 중단하였다. 브로콜리, 컬리플라워의 원형질체 배양은 배양초기가 양배추와 유사한 경향을 보였으며 역시 실험의 집중을 위해서 본 과제에서는 초기단계의 스크린을 통한 캘러스 확보로 배양 가능성의 확인 후, 실험을 다음 과제 및 독자적인 인력 확보 후로 연기하였다. 최적화된 양배추의 원형질체 배양 시스템의 확보를 통한 기본적인 원형질체 배양의 노하우를 확보하여 유사 양채류의 배양시스템의 확보도 근시일내에 확보 가능할 것이다.

### 3절. 비대칭 원형질융합 시스템 구축

#### 1. 세포질의 공여자인 무의 핵을 불활성화 하기 위하여 초원심분리기와 감마선 처리 조건을 조사

○ 초원심 분리기를 이용하여 성공적으로 핵과 세포질을 분리

실험에서 무의 핵을 제거하고자 초원심분리를 이용한 시스템을 구성하였다.

이를 위해 (주)한일과학에 연구 및 장비 개조를 요청하여 국산 초원심분리기를 이용하여 최초로 국산화된 swing rotor를 제작 받아 60,000g 까지 실험 할 수 있었다. 이를 바탕으로 성공적으로 gradient를 이용한 핵 및 세포질의 분리에 성공하였다 (그림 9). Lorz의 방법을 약간 변형하여 실험이 진행되었고 이를 통해 핵분리가 정상적으로 진행되었으며 핵이 제거된 원형질체를 얻었다. 단 실험 때마다 실험 원형질체의 밀도 정도와 삼투 정도에 따른 변인이 많으며 이를 이용한 원형질체 융합 또한 효율적이지 않음 역시 확인하였다. 이를 효율적으로 이용하는 시스템은 보다 많은 시행착오와 실험을 거쳐야 하는 관계로 초기과제 수행정도가 본 과제의 성패를 좌우하는 상황에 핵 제거는 현실적으로 많이 이용하는 감마선을 이용한 방법으로 단일화하였다.

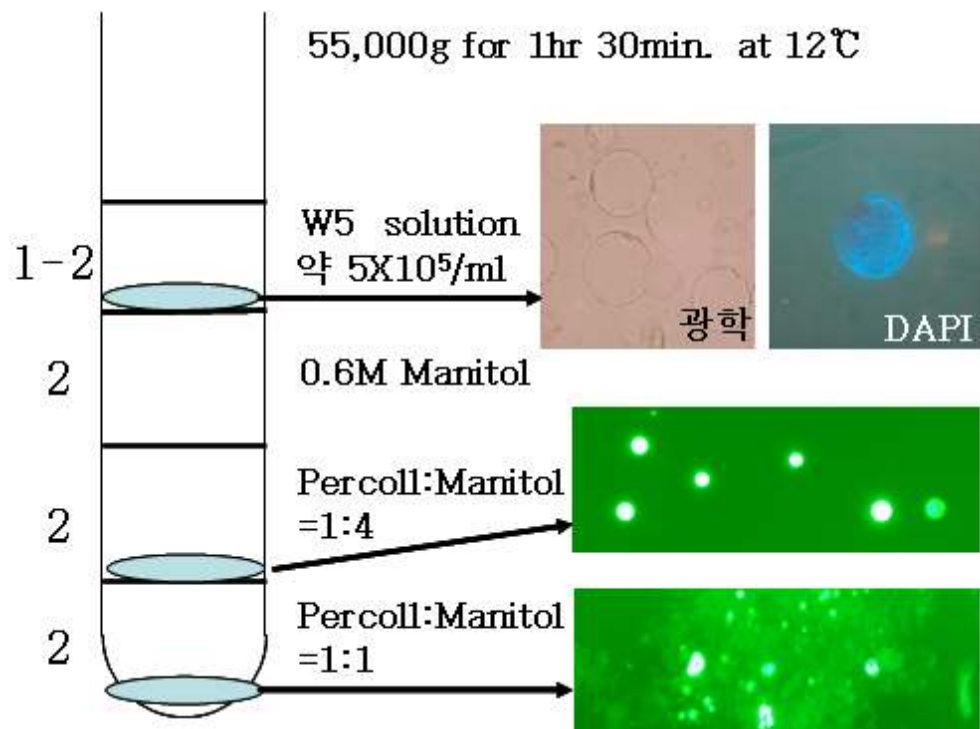


그림 9. 초원심분리를 이용한 무의 원형질체의 핵과 세포질의 분리

○ 감마선을 이용한 무의 핵의 불활성정도를 관찰

일반적으로 감마선을 이용한 핵의 불활성화는 방사성 처리를 하여야 하기 때문에 매우 제한적인 실험밖에 스크린 할 수 없다. 그러나 (주)농우바이오의 인근에 감마선 조사를 이용할 수 있는 (주)그린피아를 통해 적정 방사선 조사량을 스크린 할 수 있었고, 이를 통하여 30-50Krad의 조건에서 원형질체의 분열이 일어나지 않음을 확인하였다. (주)그린피아의 감마선 조사장치는 현재 실험에 이용하고 있다 (그림 10).

2. 핵의 공여자인 양배추와 배추의 세포질 불활성화를 위해 Iodoacetate 처리 조건을 탐색

○ 양배추의 적정 iodoacetate 농도 및 처리시간 조사

핵의 공여자인 십자화과 식물 중, 우선 양배추를 이용하여 각 농도별 시간별 iodoacetate처리를 통해 최저 처리에로 3mM iodoacetate 용액에서 15분처리로 세포 분열이 일어나지 않음을 확인하였다(그림10).

3. 원형질 융합 시스템인 PEG와 Electrofusion 방법을 이용, 최적의 융합조건 탐색

○ PEG와 Electrofusion를 이용한 융합 조건 탐색

원형질 융합시스템을 확보하고자 PEG와 Electrofusion 조건을 탐색, 두 처리방법 모두에서 원형질체 융합 현상을 확인하고 최적화 조건을 확보하였다. 실험의 자세한 내용은 논문 및 특허 준비를 위해 생략함(데이터 미첨부).

확보된 원형질 융합 체계를 이용하여 양배추를 중심으로 3년간 약 300여 차례의 융합을 실시하였다 PEG를 이용한 실험(그림. 11), 전기적 융합을 이용한 실험(그림. 12)을 통하여 초기 융합실험군부터 정상적으로 세포과 단계를 넘어 개체화 단계로 진입하고 순화 되었다. (그림 13).

순화된 개체는 바로 마커 시스템 검정을 통하여 NWB CMS 도입여부를 확인하였고 이 내용은 아래에 서술하였다. 많은 실험을 통하여 미세한 융합 조건에 따른 옹성불임 인자의 전이 여부 및 최적의 융합 노하우를 구성하였다.



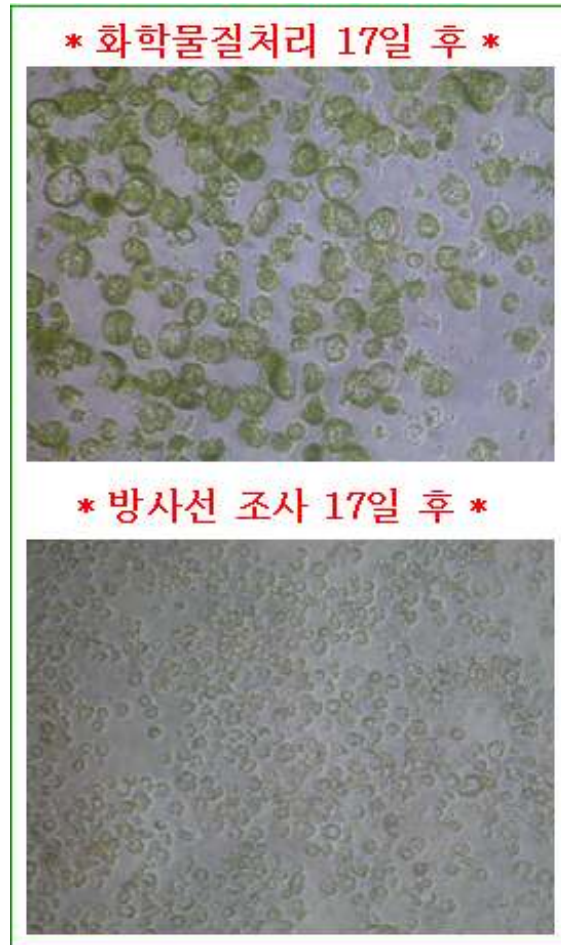


그림 10. Iodoacetate 처리(화학물질 처리)를 한 양배추 원형질체와 감마선(방사선) 조사를 한 무의 원형질체의 배양 17일 후의 사진.

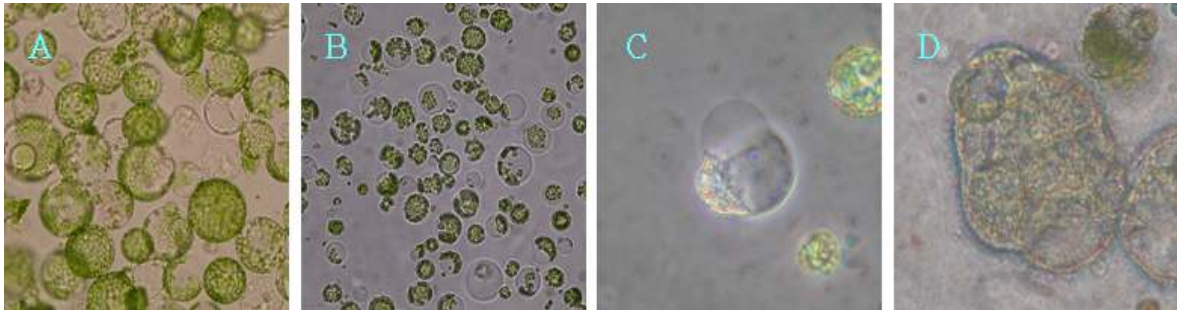


그림 11. PEG를 이용한 양배추와 무의 원형질체 융합.

A: 화학물질(IOA) 처리 양배추 원형질체, B: 감마선 조사한 무의 원형질체,  
C: 융합 원형질체, D: 융합체의 분열.

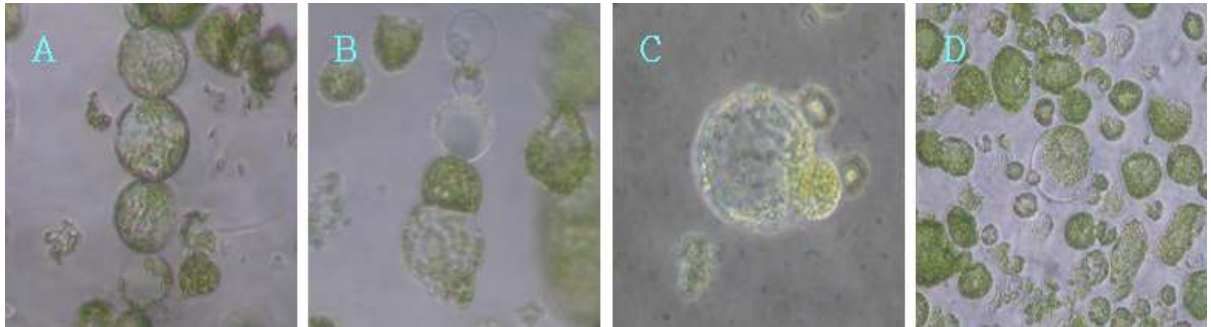


그림 12. 전기적 융합을 통한 양배추와 무의 원형질체 융합.

A: 교류전류에서 원형질체의 정렬, B: 직류전류에서 원형질체의 융합

C,D: 6일 경과후 생존 원형질체.

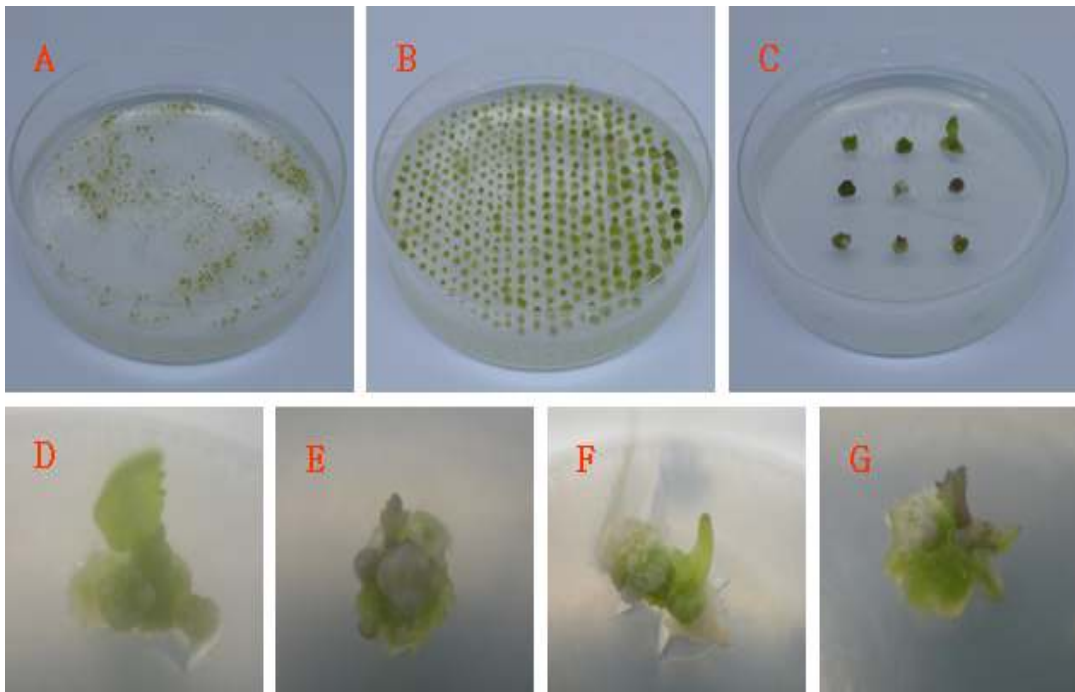


그림 13. 양배추와 무의 원형질체 융합을 통한 식물체의 재분화

## 4절. 비대칭 원형질체 융합 시스템 이용

### 1. 최적 비대칭 원형질체 융합

#### ○ 양배추와 무의 원형질 융합 시스템의 이용

1차년도에 확립된 비대칭 융합을 이용하여 각각 PEG융합 50여회, Electrofusion 70 여회를 수행하였다. 원형질 융합 시스템을 확립하고 이를 이용함에 있어서 가장 중요한 것은 원형질체의 순도임을 확인하였다. 지금까지 국내에서 가장 많은 융합을 단시간 동안 가장 많이 한 것으로 사료되며 각각의 상황에 따라 융합 조건은 일부 변화가 있음도 확인하였다. 이런 경험을 바탕으로 상황에 맞게 변화하여 실험을 수행하는 것이 매우 중요하다. 각각의 세부적인 내용은 특허를 위해 생략하며 그림 13은 양배추와 무의 IOA 처리와  $\gamma$ -ray 처리를 통한 효율적인 원형질체 선발 시스템을 보여주고 있다. 1차년도에 확립한 융합방법을 더욱 발전시켜 실험에 사용 하였다 (그림14, 15). 성공적으로 융합된 원형질체는 선발 시스템을 통하여 융합이 성공한 원형질체만 미소피로 성장하게 됨을 확인하였다 (그림16).

## 5절. 융합 식물체 CMS 형질 스크린

### 1. CMS 분자 마터를 이용한 기내 식물체의 스크린

양배추와 무의 세포융합 실험의 가장 중요한 포인트 중에 하나는 어떻게 효율적으로 NWB CMS 형질을 가진 많은 캘러스와 개체를 확보하는가 하는 것이다. 실험 초기에 많은 캘러스를 이용해 모든 캘러스로부터 개체화를 목적에 두고 실험을 수행하였으나 실제 너무 과량의 캘러스로 이의 관리에 노동력 및 시약의 낭비가 심해 이를 초기 미소괴의 마커 선발을 통해 선발된 캘러스를 통한 개체의 선발로 일부 실험 방식의 전환을 실시하였다. 이에 본 과제에서는 대부분의 실험실에서 사용하는 Manual DNA prep.과 PCR 시스템으로는 많은 실험재료를 동시에 분석 할 수 없어 (주)농우바이오에서 독자적으로 발전시키고 있는 High throughput DNA Prep. 시스템을 본 과제에 적용하였다(그림 17). 일반적으로 1명의 연구원이 한번에 기존 방식으로 DNA를 분리하는데는 최대 100 - 200개의 샘플을 소화하기도 힘든데 반하여 본 실험방법의 적용으로 하루 DNA Prep. 양을 5 - 10 배 증가 할 수 있었다.

이 high-throughput 마커 분석 시스템으로 초기 미소괴를 분석한 결과 실험에 사용한 미소괴에서 PEG 시스템에서는 약 6.9%, Electro-fusion 에서는 약 1.3%의 마커가 검출됨을 확인할 수 있었다(표 5, 그림 18, 19). 따라서 본 과제에서 수행하고 있는 비대칭 원형질체 융합 및 세포질 융성불임 인자가 전이됨을 유추 할 수 있어 지속적인 실험을 수행하였다.

육종에서는 정확한 한 개체의 융성 불임개체만 있어도 성공적으로 세포질 인자를 전이할 수 있다. 따라서 많은 독립적인 개체를 얻어 세포질인자 및 원예적 형질이 모 식물체와 일치하는지에 대한 세밀한 조사가 있어야 하기에 보다 많은 실험을 진행하고 있다.

High-throughput 마커 분석 시스템을 이용해 선발된 캘러스는 재분화를 유도하여 성공적으로 개체를 획득한 뒤 다시 마커 분석을 수행하여 NWB CMS 형질이 유지됨을 확인하였다(그림 20).

### 2. 스크린 식물체의 순화

마커 선발을 통해 얻어진 융합 재분화체는 현재 1개체가 순화가 완료되어 온실에서 재배되고 있으며 이를 EF2라 명명하였다. 이후 여러 NWB-CMS 인자를 가진 개체가 순화되었으며 지속적인 선발로 개체를 늘리는 중이다. 이는 국내에서의 여러 원형질 융합 시도 중 양배추에서 최초의 비대칭 융합을 통한 귀중한 결과이다. 실험 중 초기선발과정에서 비대칭 융합을 통해 무의 핵의 형질이 일부 전이된 것으로 보여지는 표현형이 나타남을 확인하게 되었고 이는 육종적으로 이용하기 어려운 형질을 지니게 돼서 강선발로 마커 검정 후에 육안 도

태를 실시하였다.

또한 순화시의 귀중한 실험재료의 망실을 대비하기 위해 각각의 라인은 조직배양을 통해 클론화 작업도 병행하고 있다. 현재 온실에 있는 개체는 2008년도 4월 하순에 개화가 진행되었다. NWB-CMS 형질의 발현을 확인하였다.. 양배추는 춘화처리와 유지가 매우 어려운 작물이나 현대적인 농우바이오의 육종 연구원의 도움으로 본 실험이 진행 하였다.

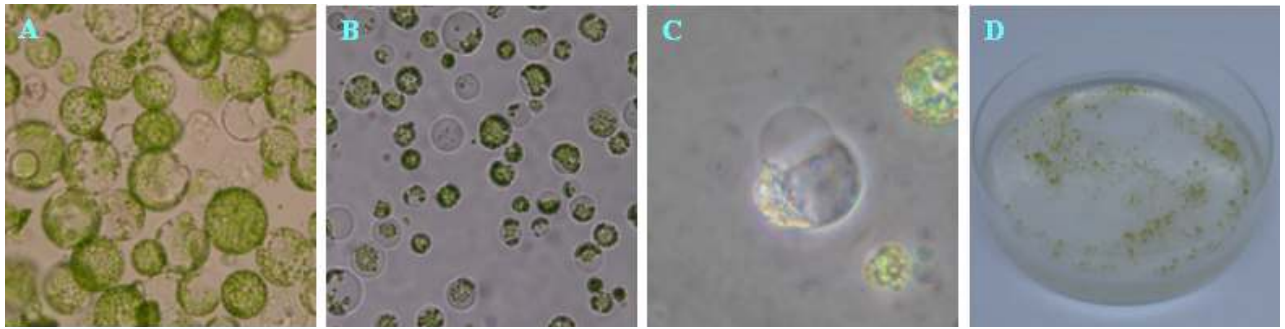


그림 14. A: cabbage protoplasts pre-treated with iodoacetate (IOA); B: radish protoplasts irradiated with  $\gamma$ -ray; C: fused cells; D: calli derived from the putative fusion cells



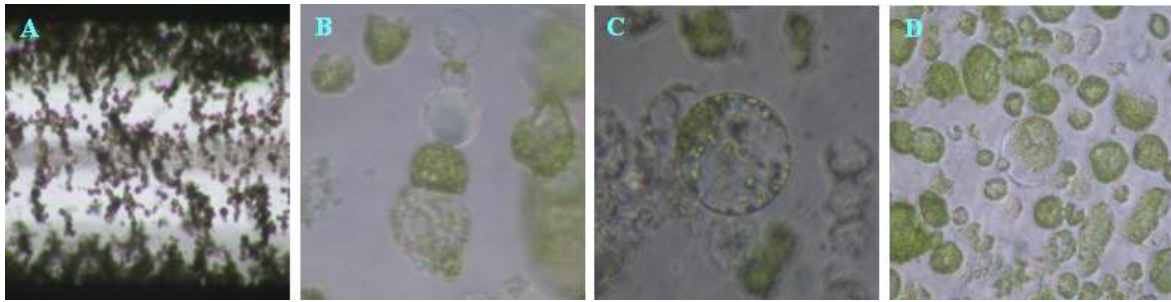


그림 15. A: pearl chain shape of protoplasts formed in AC fields; B: heterokaryotic fused cells; C,D: putative fusion cells in liquid culture medium at 6 days

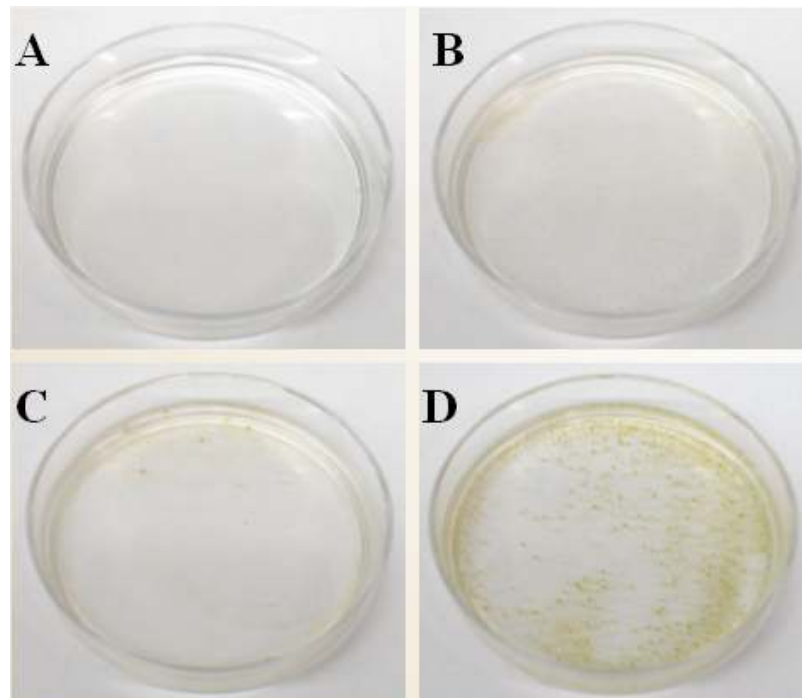
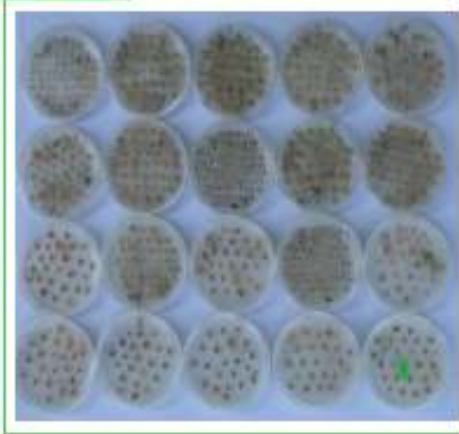


그림 16. A: protoplasts of cabbage pre-treated with iodoacetate B: protopalsts of radish irradiated with  $\gamma$ -ray; C: unfused protoplasts mixture of pre-treated cabbage and irradiated radish; D: fused protoplasts of pre-treated cabbage and irradiated radish

Calli produced by asymmetric fusion



Sampling & bulk DNA preparation



PCR analysis



그림 17. high-throughput 마커 분석 시스템

표 5. 융합 유래 캘러스의 NWB CMS 마커 검정 효율

Fusion methods	Number of protoplast/plate	Frequency of callus formation (%)	No. of calli used in marker analysis	Calli selected	
				(No. of PCR+)	(%)
Chemical-fusion	3x10 <sup>5</sup>	0.181 ± 0.151	1780	123	6.9
Electro-fusion	3x10 <sup>5</sup>	0.082 ± 0.003	1004	13	1.3

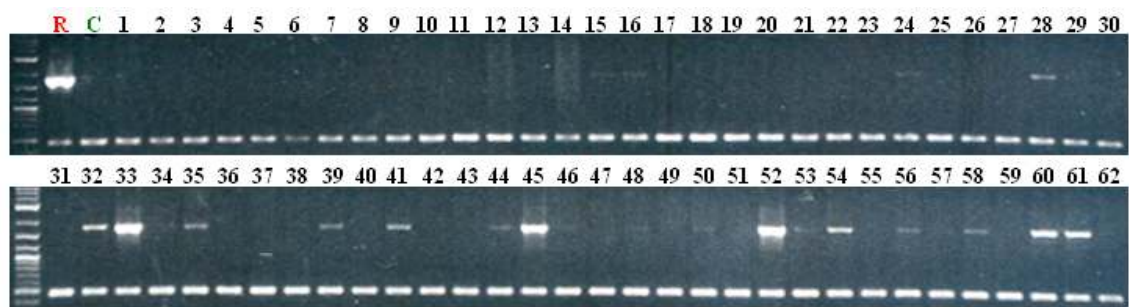


그림 18. NWB-CMS marker analysis of calli derived from asymmetric protoplast fusion by PEG

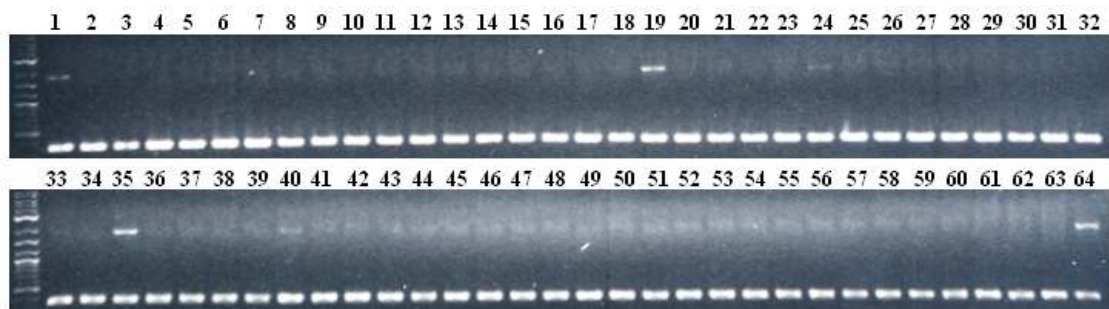


그림 19. NWB-CMS marker analysis of calli derived from asymmetric protoplast fusion by Electro-fusion

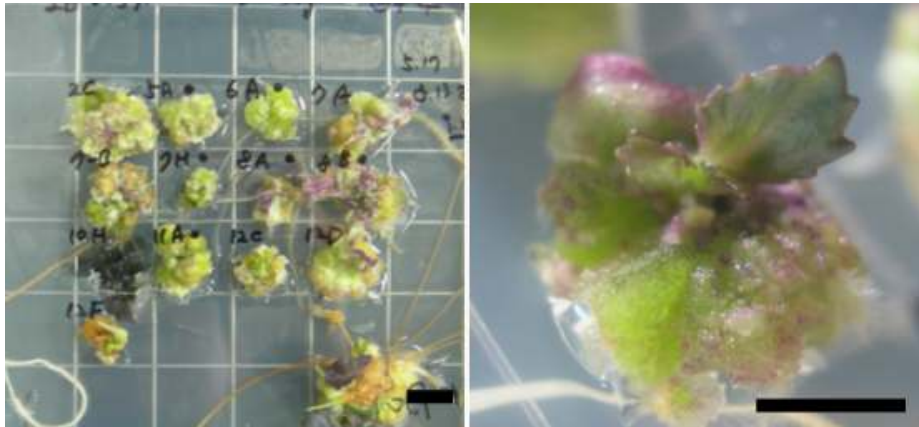


그림 20. Putative NWB-CMS cabbage plantlet regenerated from NWB-CMS marker selected callus

## 6절. 융합 식물체 선발

2차년도 결과를 토대로 2차년도 후반에 진행한 융합체중 다른 세포융합체의 지속적인 선발을 통하여 새로운 원형질 융합체를 선발하고 이를 EF3라 명명하였다. 그림 22.는 새로운 세포융합체로 기존의 EF2와는 틀리게 NWB3와 아울러 NWB1 마커까지 검증이 되어 보다 확실한 NWB 특성의 전이가 유추되는 세포융합체이다. 약 2년 이상의 세포융합체의 선발 과정을 통하여 초기 개체의 선발의 노하우를 습득하고 마커 검증이후 표현형적으로도 강선발을 수행하여 최종적으로 획득한 개체로 초기에서부터 양배추의 형질을 그대로 지닌 유망한 라인으로 생각되었다. 2차년도의 EF2의 경우 빠른 세대 단축을 통한 개체형질의 검증에 주력한 부분에서 미흡한 점으로 생각되어지는 체세포변이에 대한 검증을 위해 EF3에서는 초기 개체화 이후, 이 개체의 남은 캘러스와 조직을 이용하여 같은 형질을 나타내는 개체의 복제를 수행하였다. 2년간의 노하우로 같은 개체의 증식 또한 쉽게 진행되어 약 6개월에 걸쳐 50 개체 정도로 개체를 증식하여 이를 순화하였다. 순화된 개체는 혹시 모를 CMS 특성의 소실의 확인하기 위해 PCR을 통하여 재검증 결과 100% CMS마커를 유지하고 있음을 확인하였다 (그림21).

그림 22.는 새로운 세포융합체로 기존의 EF2와는 틀리게 NWB3와 아울러 NWB1 마커까지 검증이 되어 보다 확실한 NWB 특성의 전이가 유추되는 세포융합체이다. 약 2년 이상의 세포융합체의 선발 과정을 통하여 초기 개체의 선발의 노하우를 습득하고 마커 검증이후 표현형적으로도 강선발을 수행하여 최종적으로 획득한 개체로 초기에서부터 양배추의 형질을 그대로 지닌 유망한 라인으로 생각되었다. 2차년도의 EF2의 경우 빠른 세대 단축을 통한 개체형질의 검증에 주력한 부분에서 미흡한 점으로 생각되어지는 체세포변이에 대한 검증을 위해 EF3에서는 초기 개체화 이후, 이 개체의 남은 캘로스와 조직을 이용하여 같은 형질을 나타내는 개체의 복제를 수행하였다. 2년간의 노하우로 같은 개체의 증식 또한 쉽게 진행되어 약 6개월에 걸쳐 50 개체 정도로 개체를 증식하여 이를 순화하였다. 순화된 개체는 혹시 모를 CMS 특성의 소실의 확인하기 위해 PCR을 통하여 재검증 결과 100% CMS마커를 유지하고 있음을 확인하였다.

3차년도에 이르러 2차년도 과제심사위원들의 의견이 여러 작물의 연구 및 시스템 구축이라는 부분을 축소하고 양배추의 보다 많은 세포융합체의 선발 및 육성에 주력하라는 조언에 따라 고질적으로 세포융합체 획득에 문제점으로 진행되는 재분화율이 좋은 개체의 스크린을 통하여 AD Bantam 계열의 순계라인을 실험에 이용하였다. 실험적 경험으로 AD Bantam 라인은 보다 안정적이고 수월한 재분화가 되는 새로운 라인으로 세포융합을 진행하였다. 현재 58개체가 PCR 선발 후에 증식 및 순화 과정 중에 있다. 주목할 성과로는 이 개체 중 48개체가 NWB CMS 1,3 마커 모두를 가지고 있다는 점이다(그림 23). 이들 개체도 2009년도의

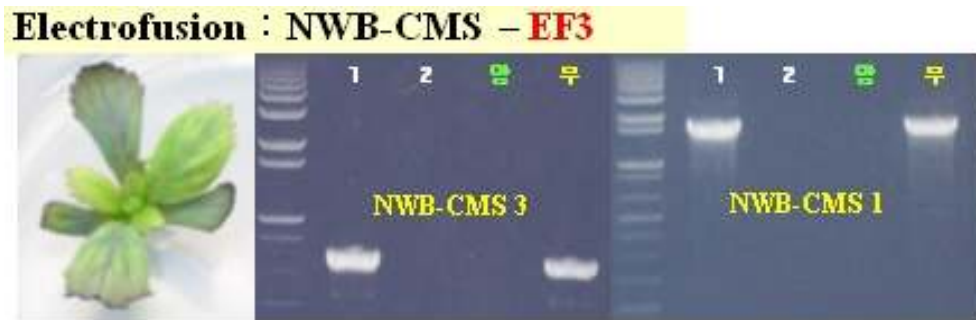


개체 육성과정을 거쳐서 2010년도 봄의 개화시기에 NWB CMS 특성을 조사하여 육성모본으로 사용여부를 확인할 수 있을 것이다.

실험의 경험과 논문에 세포융합에서 핵의 일부가 같이 끼어들어가는 개체와 아울러 많은 개체에서 미토콘드리아 내에 있는 계놈은 recombination을 거쳐서 CMS형질이 불안정해질 수도 있는 것을 알 수 있었다. 따라서 독립적인 두 NMW CMS 마커가 모두 확인됨은 안정적인 미토콘드리아 계놈의 전이 혹은 최소한 CMS 형질을 나타내는 부분의 안정적인 전이를 유추해 볼 수 있는 소중한 노하우라 할 것이다.

아울러 본 과제에서 약 90차례의 PEG를 통한 원형질체 융합이 진행되었다. 초기 연구 결과에서 마커의 검증 결과는 전기적 융합보다 우수함을 확인하였다. 또한 전기적인 융합보다 세포과의 획득 또한 고효율을 보였다. 그러나 선발체에서 많은 경우 무의 형질이 발현되는 현상을 확인하였다. 보다 좋은 선발 조건이 요구되며 결과적으로 전기적 융합을 중심으로 일을 진행하였다. 현재 8개체의 독립적인 선발체를 선발하였으며 이중 생장이 빠른 2개체는 무의 흰꽃의 화색을 가지고 있어 육종에 이용이 어렵다 사료되어 도태하였다 (데이터 미제시).

다음 원형질체 융합을 시도시에는 미토콘드리아와 핵 계놈상의 독립적인 마커를 2개 이상으로 확인함이 실험의 정확도를 높이고 선발 강도를 높이는 중요한 요소가 될 것이다.



**Origin 1개 (50개체 이상 확보) 표현형: 양배추**

그림 21. 새로운 세포융합체 (EF3)의 기내 사진 및 PCR 검증 사진

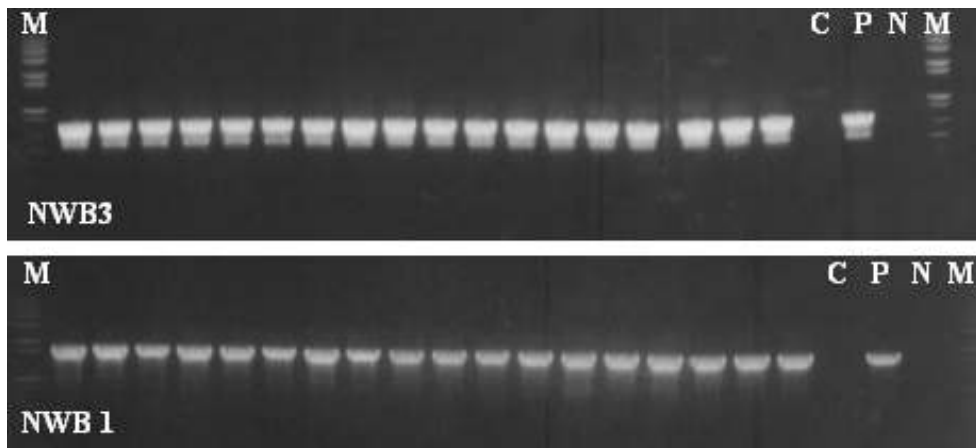


그림 22. EF3 세포융합체의 클론의 NWB3,1 마커 검정

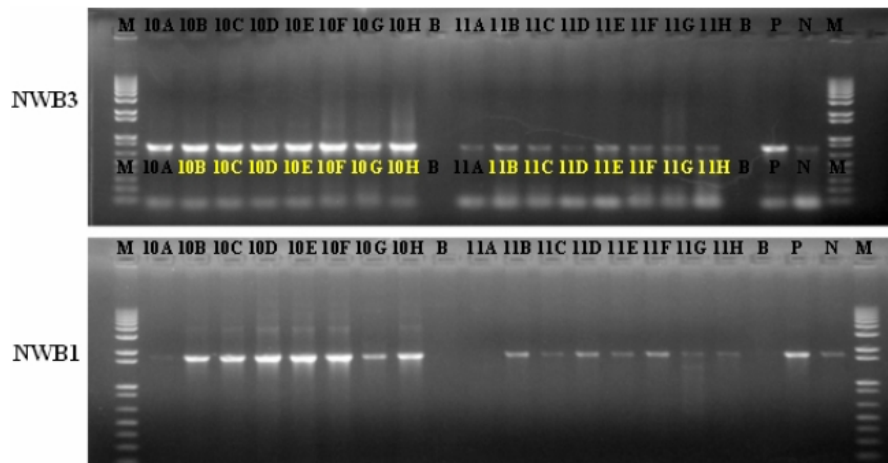


그림 23. AD Bantam 계통 순계라인을 이용한 재분화 개체의 NMW CMS 1,3 마커 검정

## 7절. 융합 식물체의 세대진전 후 MS 특성을 검정

### 가. EF2의 MS특성 검정.

3차년도에 이르러 EF2라 명명한 선발체는 개화를 하였고, 초기 화아를 검사해본 결과, 화분의 생성이 없음을 확인하여, 일차적인 융성불임인자의 전이가 되었음을 확인하였다. 그림과 같이 초기 화아 구조를 확인하여 꽃가루가 생성 되지 않음이 확인되었다.

모식물체와의 비교에서도 꽃의 구조나 화서에서는 큰 차이가 없었으며 약간의 꽃잎 색이 연한 것과 화서간의 절간 간격이 약간 짧은 것을 제외하고는 큰 차이는 발견할 수 없었다 (그림 24).

본 그림은 개화된 꽃의 정면 사진으로 Ogura CMS가 꽃밥이 완전히 말라 형태만 유지하고 있는 것에 비하여 본 실험의 원형질 융합체는 꽃밥구조가 보다 아래쪽으로 향하고 말라죽지 않아 보다 화분매개체의 유도가 쉬울 수도 있는 좋은 특징을 보임을 확인할 수 있었다 (그림 25, 26).

그림 27는 모본식물과 원형질 융합체의 횡단면구조로 꽃밥구조를 확인할 수 있었다. 꽃밥구조를 제외한 꽃의 구조가 정상적임을 확인할 수 있었다. 육종회사에서 양배추 육종에서 가장 중요시하는 형질중의 하나는 암술머리와 씨방의 정상여부로 이 부분의 이상은 육종 특성상 도태하는 것을 원칙으로 하고 있다. 본 과제의 진행을 통하여 정상적인 꽃구조를 얻어 육종 재료로 이용 가능함을 육종연수소의 연구원의 검증을 통해 확인하였다. 그림 상단은 꽃밥의 확대사진으로 모식물체는 꽃밥이 터져 화분이 나출되는 시기에 세포융합체는 꽃밥이 퇴화되지는 않으나 내부에 화분이 없어 찌그러진 형태를 보였으며 해부결과 화분이 없음 역시 확인하였다.

이후 정상의 동일 라인의 모식물체(MF)인 개체의 꽃으로부터 화분을 여고잡(Back Crossing)을 통하여 수정시켜 MS 특성의 전이여부를 확인하였다. 그림 28에서 보는 것처럼 교잡의 초기과정에서 수정의 징후로 씨방이 커지는 현상까지 확인하였다. 불행히 이 개체는 수정이후 꼬투리가 갈라지는 현상이 관찰되었고, 초기 배주의 확장까지 진행중에 이 현상에 의해 배의 성장이 중지되어 씨를 얻기 어려운 상태가 되었다.

그러나 일부 꼬투리는 꼬투리기 확장한 상태에서 꼬투리의 성숙이 이루어 졌다. 그러나 꼬투리의 표현형은 모본 식물체의 꼬투리처럼 미끈한 구조가 아니 불균등한 비대가 이루어졌다 (그림 29).

불균등한 비대가 이루어졌지만 비대가 이루어진 꼬투리를 교배 후, 약 2달 후에 꼬투리의 색이 갈색으로 변하였을 때 채취하여 20-25℃의 건조한 곳에서 약 1달간의 후숙과정을 거쳐서 종자의 여부를 확인하였다(그림 30). 최종적으로 이 세포융합체에서는 종자의 결실이 이루어지지 않았다. 일부 정상적인 꼬투리의 내부에서 종자의 생성이 중단되어 있었으며, 불균등한 비대가 이루어진 꼬투리는 내부에 불규칙적인 내벽이 생성되는 특성을 확인하였다.

이에 따라 육종회사의 특성상 특히 화아 구조 및 교배에 불리한 특성의 내재는 현실적으로 육성라인은 불가능하여 적극적인 도태를 시행한다. 따라서 이 라인에 대한 육종적인 이용이 사실상 어렵다고 판단하여 폐기를 하였다. 본 라인에 관한 더 이상의 연구의 진행은 중단하였다.



그림 24. Putative NWB-CMS cabbage

**Control Flowering – C564 (Ace Green)**



**EF 2 (NWB-CMS III)**



그림 25. 모식물체와 세포융합체의 화서구조



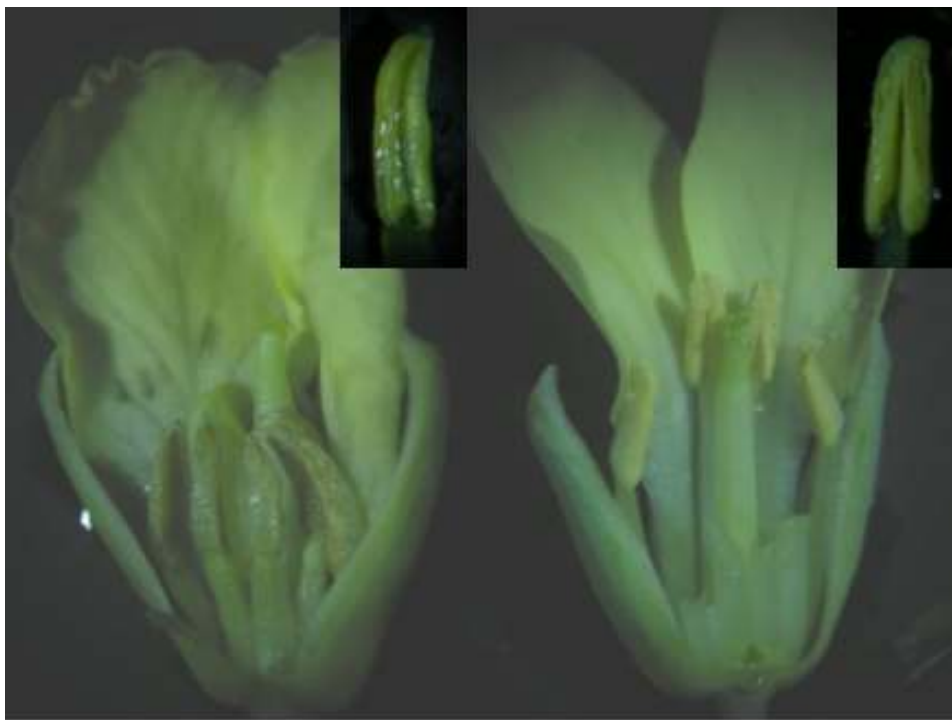


MF

NWB-CMS: EF2

Ogura-CMS

그림 26. 모식물체와 세포융합체, Ogura-CMS의 꽃 표현형



**EF 2 (NWB-CMS III)**

**Control; MF, Ace Green**

그림 27. 모식물체와 세포융합체의 꽃 표현형(횡단면)

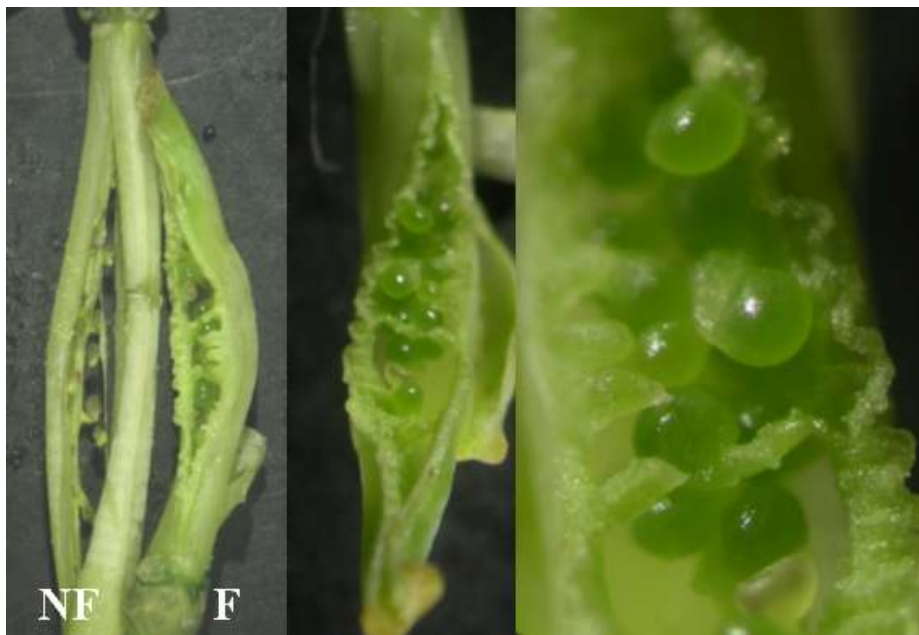


그림 28. 모식물체와 세포융합체의 꽃 표현형(횡단면)



그림 29. 세포융합체의 꽃과 꼬투리의 표현형



그림 30. 세포융합체의 꽃과 꼬투리의 표현형

## 나. EF3의 MS특성 검토.

EF3는 표현형적으로 양배추의 특성을 갖추고 있어 육종연구자의 선발기준에도 합당한 것으로 확인하고 본격적인 재배환경의 최적화를 통하여 개체를 성숙시켰다. 약 1달간의 순화와 2차 2달간의 인공기상실의 적응을 통해 성공적으로 재배온실에서 재배가 이루어 졌다(그림 31). 재배온실에서 재배된 EF3는 2008년 8월에 세대단축을 위한 인위적인 춘화처리를 2달간 실시하여 성공적으로 춘화처리가 수행하여 11월경에 개화가 진행되었다(그림 32).

초기 EF3의 화서가 신장되는 시점에 어린 화아를 채취하여 초기 화아(꽃잎, 꽃밥, 암술머리)의 미세구조를 관찰한 결과 모식물체와 형태적으로 꽃밥 구조의 차이를 제외하고는 형태가 동일하였다. 그림 33과 같이 EF3와 모식물체의 꽃밥을 횡단면으로 증류수 상에서 절단한 결과 모식물체의 꽃밥에서는 절단 즉시 화분이 확산되는 것을 확인하였으며 EF3의 꽃밥에서는 어떠한 화분의 흔적도 없이 내부가 비어있음이 확인되었다.

초기화서에서 개화된 EF3의 꽃의 개화사진(그림 34)으로 정상적인 양배추의 개화 사진과 차이가 없음을 확인하였다. EF3는 EF2에서 보이던 꽃잎의 찌그러짐도 거의 없고 화판의 색도 정상으로 꽃밥을 제외한 나머지 형질이 모식물체와 거의 차이가 없음도 확인하였다.

EF3의 꽃구조를 확인하기 위해 꽃의 근접사진과 꽃잎을 제거한 뒤 생식구조의 차이점을 형태적으로 확인하였다 (그림 35). 꽃잎의 표현형이 모식물체와 동일하도 꽃밥은 모식물체가 같은 시기에 화분이 방출되는데 반하여 격하게 꽃잎을 따는 동작에서도 어떠한 꽃가루도 방출되지 않는 것을 확인하였다.

이로써 3년간의 연구결과를 통하여 EF3라는 양배추의 순계 NWB CMS 계통을 확보하였다.

화분의 생성이 없음을 확인한 EF3의 개체에 모식물체의 꽃가루와 다른 계통의 화분을 여교잡을 수행하였다. 2008년도 가을의 이상고온현상으로 초기에 모식물체의 꽃가루가 정상적으로 교잡에 이용하기 어려운 시기가 있어, 실험의 교잡이 실패 할 확률이 있어 화분친과 EF3 개체들을 25℃ 상시 유지되는 인공기상실로 옮겨 교잡을 실시하였다. 가장 활력이 좋은 초기의 꽃에서 교잡을 진행할 수 없어 약 1달간의 공백이후 화분친인 모식물체의 화분이 정상적으로 배출되는 시기에 교잡을 다시 진행하였다. 약 1달간의 관찰을 통해 일부개체의 꼬투리에서 꼬투리가 부풀어 오르는 현상이 관찰되었다(그림 36). 이를 통해 일부 개체의 종자를 얻을수 있었다. 현재 총 26개의 종자를 획득하였다. 이중 6개 내외의 종자가 충실한 것으로 보여지고 있으며, 이를 후속 과정을 진행, 조만간 파종을 통하여 종자발아여부의 확인이 이루어 질 예정이다(그림37). 만일 발아가 정상적으로 진행된다면 본과제의 최종 목적인 NWB CMS 육종라인의 획득이 되는 것이고, 이의 정상적인 개화와 NWB CMS 특성 조사는 2010

년도에 확인될 것이다. 정상적인 육종라인임이 확인된다면 본 실험의 실험결과를 토대로 특허 출원을 수행할 예정으로 특허 출원 후, 이에 대한 논문을 발표될 예정이다. 양배추의 육종 특성상 세대진전이 느려 본 결과의 특허와 논문의 획득이 약 1년 정도 지연될 것으로 사료된다. 또한 춘화처리과정 후의 이상고온과 인공기상실의 조건으로 결실정도가 미약한지 확인위해 현재 개체의 재 개화 처리를 진행 중에 있으며 아울러 증식 후 기내에서 보관중인 개체의 일부를 다시 순화하여 2010년 봄 개화시기에 맞추어 본 EF3의 육종 라인이용 여부의 최종적인 결정이 진행될 예정이다. 또한 이시기에 앞서 새로 획득한 AD Bantam 계열의 새로운 융합체의 MS 특성조사도 병행하여 가장 좋은 형질을 가진 개체들을 대상으로 육종 프로그램에 이용 예정이다.

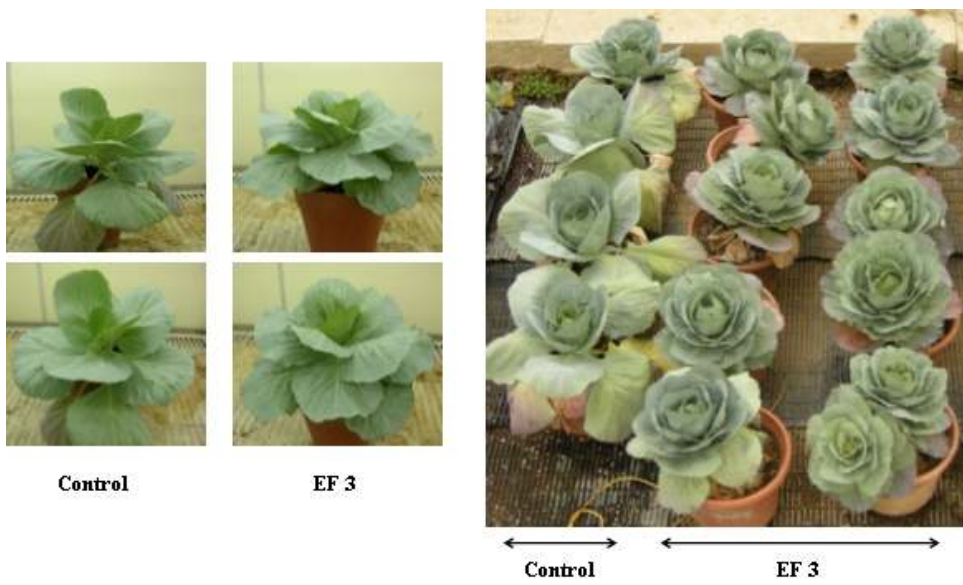


그림 31. EF3 개체의 모식물체와의 초기 순화 및 재배온실에서의 형태비교





그림 32. EF3 개체의 모식물체와의 춘화 처리 및 재배온실에서의 개화.

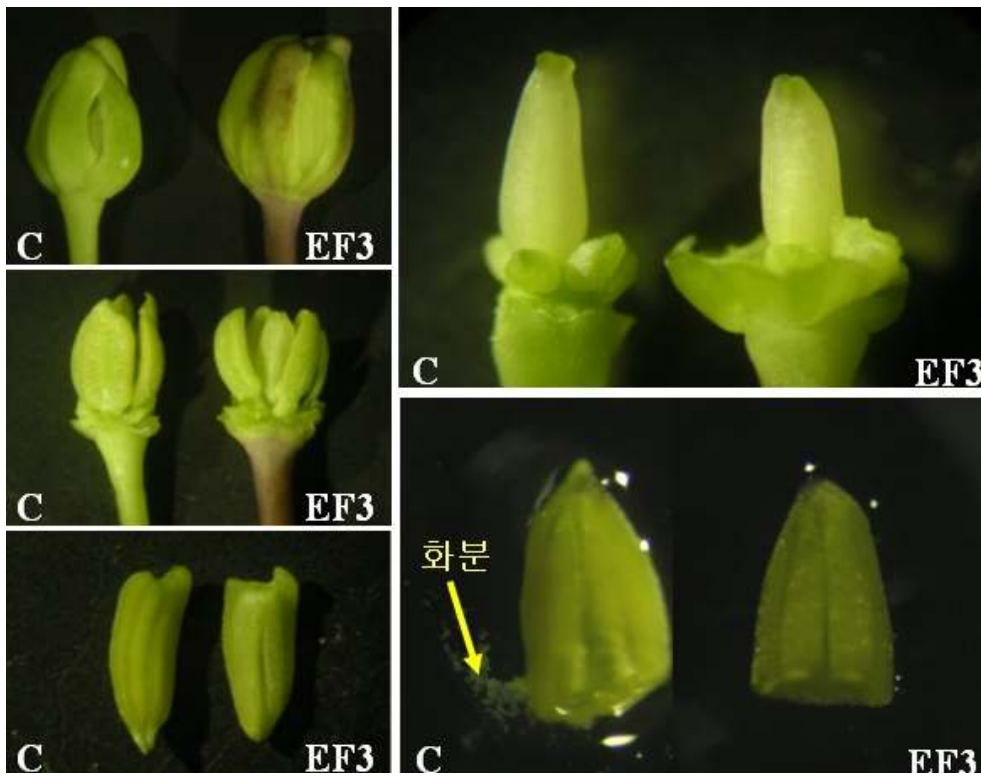


그림 33. EF3의 초기 화아(꽃잎, 꽃밥, 암술머리)의 미세구조



그림 34. 서로 독립적인 EF3 클론간의 꽃 사진.

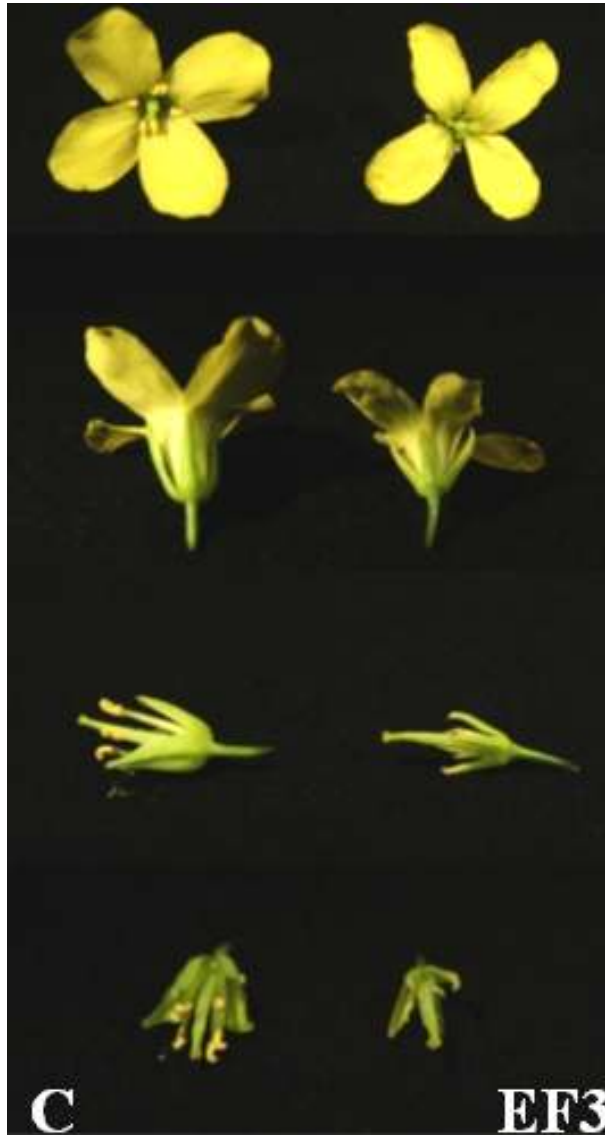


그림35. 양배추 모식물체와 EF3의 꽃의 외부구조와  
 꽃잎을 제거한 생식기관 구조



그림 36. EF3의 종자 결실



그림 37. EF3 교잡을 통해 얻은 종자 접사 사진

본 과제를 마치며 몇 가지 중요한 실험 요인에 대해 서술하고자 한다. 식물세포융합은 오랜 노하우와 매우 다루기 어려운 식물원형질체를 이용하여 현재 국내에서는 시도하는 곳이 매우 제한적이다. 특히 세포융합에서는 문서와 되지 않는 노하우가 많아 외국 논문대로 쉽게 실험이 재현되지 않는 대표적 분야로 많은 국내연구자들이 시도해 제한적인 연구결과를 얻는데 그치는 이유 중의 하나일 것이다. 3년간 약 300번 가량의 원형질 융합을 수행하면서 기초적인 국내 인프라 및 시설의 중요성을 느끼게 된다. 거의 대가 끊긴 연구를 복원하는 것은 정말로 많은 시간과 재화가 투자되어야 한다. 논문 외에는 몇몇 선행연구자들의 경험을 들을 수 있었던 것이 거의 전부라 할 것이다.

1. 일단 식물 세포융합을 시도하고자 하면 종묘회사가 취급하고 있는 양채류 등의 경우에는 관련 종묘회사로부터 순계 계통의 이용여부를 우선 확인하고 실험을 디자인하여야 한다. 목본 및 기타 품종 개념이 없는 종은 가능하면 OP 혹은 재래종이라도 안정적인 생장 및 유전적 다양성 정도를 먼저 확인한 후 실험을 수행하여야 한다. 이는 실험의 가장 중요한 요인이다. 종묘회사에서 취급하는 종은 이미 체계화되어 있는 계통 육성 라인을 이용해야 종묘회사와의 공동연구가 가능할 것이다. 일례로 양배추의 육성 연한은 기본 15년으로, 최소 F1 품종의 고정에 5-7대의 세대진전이 필요하다. 또 세대진전도중 세포융합 계통의 특성이 육종가들이 원하는 방향과 불일치하는 경우 이를 육종가가 원하는 특성으로 전이시키는데 역시 비슷한 시간이 필요하다. 따라서 특히 양채류의 F1 품종을 이용한 세포융합체의 획득은 F1의 특성상 세포활성이 좋아 원형질체 융합의 초기 실험결과를 빠르게 얻을수 있다는 장점을 가지고 있고 실험 접근도 수월하지만 실제 육종적인 이용에서 막대한 시간의 투자가 들어가는 우를 범할 수 있다. 물론 이 부분의 극복 또한 아이러니컬하게 세포융합을 통한 같은 계통내의 핵치환 기술로 단번에 극복이 가능하지만 실험에서의 현실적으로 체세포클론 변이, 계통간의 재분화율의 차이 등을 모두 극복하는 최상의 시스템 구축은 매우 제한적으로 존재함 또한 무시할 수 없는 현실이다.
2. 현재 가장 중요한 장비인 전기적 융합장치가 국내에는 여러 대가 있다. 그러나 현재 본격적으로 이용하는 곳은 몇 곳 없다. 또한 융합에 필요한 chamber 또한 절판되어 구하기가 어렵다. 즉 연구자가 각자 실험하고자하는 원형질체의 특성과 전기적 융합장비의 특성을 종합적으로 판단하여 최적의 융합 chamber를 스스로 고안하고 만들어야 한다. 관련 선행자의 도움과 다른 분야인 전기, 소재부분의 고민 없이 식물세포융합을 시도하기는 매우 어렵습니다. 선행연구자의 도움이 필요하다..
3. 실험실에서 비대칭 융합을 수행하고자 한다면 반드시 전기적 융합을 시도하시는 것이 좋다. 동형융합을 위해서는 PEG등 화학적 융합도 가능하다. 선행연구자의 경험상 화학적 융합으로 비대칭 융합의 시도는 안하시는 것이 좋을 듯하다. 결과 얻기가 매우 어렵다.

4. 비대칭 세포융합의 핵심 기술은 얼마나 원형질체 배양 시스템이 잘 갖추어 지느냐와 선발의 편의성을 확보하였는가 하는 것이다.
5. 초원심분리를 통한 핵제거 기술을 이용해서는 전기적 융합 기술의 이용이 어렵다. 화학적 융합을 이용한 최적화 기술을 정립하기 전에는 이용에 신중해야 한다.
6. 기업에서 세포융합과제의 시도는 기초적인 분야로 지속적인 투자와 인력의 유지가 제한적인 부분입니다. 이 부분은 국가연구소에서 관련 인프라를 구성하고 인력의 안정적인 존속을 통해 노하우를 보유해야 한다. 이를 기반으로 기술을 원하는 기업체나 대학 등에 기술의 전수 및 이용을 장려하는 것이 타당할 것으로 보인다. 이 기술의 운용에는 최소 10년 이상의 경험자가 필요하다. 실험의 수행은 쉽게 시도할 수 있으나 결과의 획득은 오랜 기간의 노하우 없이는 사실상 어려운 고난이도 기술이다.
7. 종묘사업은 국가적으로 매우 중요한 부분으로 특히 농업 부분의 경쟁력의 핵심부분이라 할 것이다. 생각보다 대규모의 재화가 연구에 들어가며, 아울러 산림정책처럼 10년 이상의 체계적이고 장기적인 로드맵에 따라 인력양성과 기술 축적이 필요하다.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절. 연구개발목표의 달성도

목 표		연구개발 수행내용	달 성도(%)
1	무, 배추, 양배추, 브로콜리 계통의 원형질체 배양 시스템 구축	원형질체 배양 시스템 확립 1. 식물체의 원형질체 효율적인 유리 조건을 확보함. 2. 핵의 공여자인 십자화과 작물의 원형질체 배양시스템을 확인-양배추, 배추 원형질체 배양 시스템 스크린함. 주요 작물인 양배추 최적 시스템 확보	100%
2	비대칭 원형질체 융합 시스템 구축	비대칭 원형질융합 시스템 확립 1. 세포질의 공여자인 무의 핵을 불활성화를 위한 초원심분리기와 감마선 처리 조건을 확보함. 2. 핵의 공여자인 양배추와 배추의 세포질 불활성화를 위해 Iodoacetate 처리 조건을 확보함 3. 원형질 융합 시스템인 PEG와 Electrofusion 방법을 이용, 최적의 융합조건 탐색함	100%
3	비대칭 원형질융합 시스템 확립	1. 현재 효율적인 원형질체 비대칭 융합 기술을 이용하여 약 300차례의 융합을 실시하였다. 2. 이 시스템을 통하여 많은 세포 융합캘러스와 개체를 확보하고 있으며 계속적으로 융합가능개체를 생산하여 본과제의 안정성을 확보함.	100%
4	융합 식물체 CMS 형질 스크린	1. 비대칭 원형질융합시스템을 이용한 융합가능개체의 기내 식물체를 이용한 스크린을 통하여 대량의 융합가능 캘러스와 개체를 선발하였다. 2. 기존의 마커 검정을 현대적인 대량 마커 검정 시스템을 접목하여 업무효율도 높였다.	100%
5	융합 식물체 선발	1. NWB CMS 마커 검증을 통한 캘러스로부터 식물체를 재분화 하여 개화를 확인함. 2. 새로운 양배추 계통을 이용하여 보다 효율적인 재분화 시스템을 확보하고 NWB-CMS마커 검증을 통한 다량의 예비 세포융합 개체를 확보함.	100%
6	융합 식물체의 세대진전 후 MS 특성을 검정	1. EF2 개체를 이용하여 개화에 성공함. 2. EF3 개체를 확보하여 개화와 아울러 종자를 획득함. 이를 통하여 육종진전을 성공하였음. 안정적인 CMS 특성 재검증을 위한 시간이 필요함. 3. 차후 새로운 라인으로 획득한 세포융합체의 개화여부를 관찰 예정임.	100%

## 2절. 관련분야의 기술발전예의 기여도

### 1. 양배추 계통의 원형질체 배양 시스템 구축

- ▶ 양배추 계통의 원형질체 배양 및 재분화 기술: 세계 최고 수준의 순계 양배추 배양 효율을 확보함.

### 2. 비대칭 원형질체 융합 시스템 확립

- ▶ 국내에서 대량 원형질체 융합을 수행할 수 있는 최고의 시스템을 확보함.
- ▶ 국내에서 현재 구입하기 어려운 식물 원형질체 배양용 chamber를 스스로 자작기술을 확보하여 각 작물 특성별 원형질체 융합 장치의 제작 및 이용의 효율성을 확보함.
- ▶ 이를 통하여 식물 원형질 융합 chamber 제작 노하우 역시 확보함.

### 3. 융합 식물체 CMS 형질 스크린 및 선발

- ▶ (주)농우바이오의 국내기업 독자적인 대량분석 시스템을 이용, 효율적인 융합체 분석 시스템을 구축함. 기존 선행 연구자들의 연구결과를 진보시켜 국내 기술의 자립적 기반을 확보함.

### 4. 융합 식물체의 세대진전 후 MS 특성 검정

- ▶ 국내 최초로 양배추에서 비대칭 원형질체 융합을 통한 NWB CMS 특성을 가진 개체를 확보하고, 개화시에 CMS 형질역시 확보하였으며, 아를리 종자의 획득까지 성공하여 비대칭 융합을 이용한 원형질체 융합 시스템의 자립적 기술을 확보함.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절. 연구개발 성과

#### 1. 관련저서 출판 :1건

○ I 식물조직배양의 기초지식, Chapter 5. 원형질 융합체 생산 기술. 인동수, 김석원, 유장렬, 한지학. 식물 형질전환, 정문각 2007.3 한지학 외 76인 pp65-73.

#### 2. 관련 논문 출판: 1건

○ In D. S., M. J. Song, I. C. Jang, B. W. Min, S. H. Nahm, J. S. Shi, S. W. Lee, C. H. Harn. 2008. Regeneration of symmetric protoplast fusion between cabbage (*Brassica oleracea* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.). J of plant biotechnology 35(2) 121-126.

#### 3. 관련 학회 발표

○ In D.S., I. C. Jang, M. Jung, B. K. Kim and C.H. Harn. An efficient system for protoplast isolation of *Brassica* and *Raphanus* species. 한국육종학회 & 한국식물생명공학회 공동 심포지엄 및 학술대회, 2006년 6월 15-17 PP 164

○ In Chang Jang, Dong Su In, and C.H. Harn. Putative cell fusion between Radish (*Raphanus sativus*) and cabbage (*Brassica oleracea*) 한국식물과학협회 창립기념 학술대회 일시: 2006년 11월9-10일 pp66

○ Jang I.C., D. S. In and C.H. Harn. High-throughput marker analysis system for asymmetric hybridization of somatic cells isolated from cabbage (*Brassica oleracea*) and radish (*Raphanus sativus*). 2007년 춘계 식물생명공학회.

○ In D. S., I. C. Jang. In, C. H. Harn. A Novel CMS Cabbage Produced by Asymmetric Protoplast Fusion. 2008 춘계식물생명공학회.

#### 4. 기타 준비중인 성과.

양배추의 세대가 길어 최종적인 세대진전을 통한 안정한 NWB CMS 입을 확인후, 특허 출원후 관련 데이터를 해외저널에 투고 예정임\*.

## **\* 실용화-산업화 계획**

본 과제는 (주)농우바이오 소유의 순계 계통을 이용한 결과로 순계계통은 타 회사로의 반출이 불가능하다. 본 과제의 결과물로 만들어진 NWB CMS 양배추 계통들은 1 - 2 년 내에 CMS 특성의 검증을 거치게 되고, 이를 통한 육성프로그램의 전개가 진행되어 우리나라 고유 품종임이 확인되는 우수한 종자생산능력을 가진 양배추 품종화 사업에 이용되게 된다. NWB CMS 특성이 확인된 양배추의 계통은 세포융합을 통한 브로콜리 및 컬리플라워의 NWB CMS 형질 전이 연구와 더불어 이들 종의 특징인 교배육종을 통한 NWB CMS 전이도 가능하여 이를 통한 브로콜리와 컬리플라워로의 CMS 특성 전이와 품종 개발에도 이용될 수 있다. 이를 통해 (주)농우바이오는 독자적인 양채류의 육성불임 육종 프로그램을 이용할 수 있게 된다.

## **\* 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등**

기업의 특성상 CMS 육종프로그램의 전수는 특허권의 이용 계약과 더불어 이루어질 수 있으며, 기타 공동 연구 등을 통하여 본 과제를 통해 얻은 노하우를 공유할 수 있다.

## **\* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등**

본 과제의 핵심적인 특허는 안정적인 NWB CMS 종자의 재 개화 및 특성검증이 이루어진 다음에 이루어지게 된다. 장기적인 양배추의 육성 기한의 문제로 현재 약 1년간의 NWB CMS 특성의 재 검증이 요구된다. 따라서 실험의 노하우 및 관련 보고서 등의 한시적인 배포 금지가 필요하며 현재 특허 및 논문의 작업이 진행중으로 CMS 특성의 재검증을 통해 정확한 시점에 특허를 출원하고 같은 시기에 해외논문에 투고 할 예정이다.

## **\* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등**

본 과제를 통하여 확보한 식물 원형질체 비대칭 융합의 기술은 현재 국내에서 가장 앞서가는 기술로 양채류는 물론 산형과 및 가지과등의 육종프로그램을 도와주는 핵심적인 역할이 가능하다. (주)농우바이오에서 확보하고 있는 소포자 배양 기술과 형질전환 기술, 배수체화 기술의 융합을 통하여 육종가 및 관련 연구자가 원하는 품종의 특성의 전이 및 육종 소재의 개발에 유용하게 이용될 것이며, 이미 일부 세포융합기술의 이용이 (주)농우바이오에서 실시 중에 있다(기업의 비밀 프로젝트로 공개는 불가함).

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 과제를 수행중 많은 논문 검색을 통해 중국의 세포융합 기술이 괄목할 만큼 성장하였음을 확인하였다. 1980-90년대 후반까지 서구 수학하던 많은 중국 과학자들이 2000년도 초반부터 자국에 들어가 국가연구소 및 대학에서 다양한 소재를 이용한 세포융합 기술을 적용하고 있음을 논문검색을 통하여 확인할 수 있었다. 현재 미국과 영국 등의 선진국에서는 세포융합 기술이 일부 종묘회사와 대학에 남아있고 이용되지만 많은 경우 연구개발이 줄어드는 경향을 보이고 있는데 반하여 중국은 계속적으로 많은 논문이 나오고 있음으로 볼 때 얼마나 많은 인프라가 있는지 가늠하기 어려운 실정이다. 이는 “우리나라가 왜 식물 세포융합 기술의 자립을 해야 하는가’에 대한 답이 될 수 있는 부분으로, 막대한 시장적인 가치가 있는 아시아 시장에서 조만간 국내 혹은 외국 우량 품종이 핵치환을 통해 MS 형질의 타파될 수도 있음을 의미하며 또한 중국의 광대한 유전자원을 이용한 새로운 육종재료가 단기간에 육종 소재로 이용 가능 할 수도 있는 개연성을 확인할 수 있는 부분이다. 원형질체 융합기술의 이처럼 자국에서 누군가 핵심 기술을 가지고 있지 않으면 기술이 단절되기에 이에 대한 준비와 마커, 소포자, 반수체 배양 등 국내에서 개발되어 있는 기술의 안정적인 전수와 개발을 담당할 상호보완적인 연구 인프라 구축이 시급히 요구된다 할 것이다.

## 제 7 장 참고문헌

- Cardi T, Earle ED (1997) Production of new CMS *Brassica oleracea* by transfer of 'Anand' cytoplasm from *B. rapa* through protoplast fusion. *Theo Appl Genet* 94: 204-212
- Handa H, Gualberto JM, Grienenberger JM (1995) Characterization of the mitochondrial orfB gene and its derivative, orf224, a chimeric open reading frame specific to one mitochondrial genome of the "Polima" male-sterile cytoplasm in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Curr Genet* 28: 546-552
- Heath DW, Earle ED (1995) Synthesis of low linolenic acid rapeseed(*Brassica napus* L.) through protoplast fusion. *Ehphytica* 93:339-343
- Jourdan P.S., E. D.Earle and Mutschler M.A. (1989) Synthesis of male sterile, triazine-resistant *Brassica napus* by somatic hybridization between cytoplasmic male sterile *B. oleracea* and atrazine-resistant *B. campestris*. *Theor Appl Genet* 78: 445-455
- L'Homme Y, Brown GG (1993) Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile *Brassica* mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus. *Nucleic Acids Res* 25: 1903-1909
- Liu JR, Lee HS and Kim SW (1992) Inter-family somatic hybridization between carrot (*Daucus carota*) and Korean ginseng (*Panax ginseng*). The 1st Korea-Germany Joint Symposium in Plant Biotechnology pp. 153-160
- Lörz H, Paszkowski J, Dierks-Ventling C, Potrykus I (1981) Isolation and characterization of cytoplasts and miniprotoplasts derived from protoplasts of cultured cells. *Physiol Plant* 53:385-391
- Nahm SH, Lee HJ, Lee SW, Joo GY, Harn CH, Yang SG, Min BW (2005) Development of a molecular marker specific to a novel CMS line in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theo Appl Genet* 111: 1191-1200
- Singh M, Hamel N, Menassa R, Li XQ, Young B, Jean M, Landry BS, Brown GG (1996) Nuclear genes associated with a single *Brassica* CMS restorer locus influence transcripts of three different mitochondrial gene regions. *Genetics* 143: 505-516
- Zimmermann U, Scheurich P (1981) High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* 151:26-32