

최 종
연구보고서

**종묘산업의 국제경쟁력 향상을 위한
주요 십자화과 채소의 종속간의 체세포잡종기술 개발**

Development of somatic hybridization techniques of major
Brassica vegetables for the improvement the international
competition of the seed industry

연구기관
강원대학교 농업생명과학대학

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “종묘산업의 국제경쟁력 향상을 위한 주요 십자화과 채소의 종속간의 체세포잡종기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 1 월12 일

주관연구기관명 : 강원대학교
총괄연구책임자 : 임학태
세부연구책임자 : 이철우
연 구 원 : 염옥희
연 구 원 : 조미애
연 구 원 : 이경아
협동연구기관명 : 중앙종묘(주)
협동연구책임자 : 이 철 우

요 약 문

I. 제 목

종묘산업의 국제경쟁력 향상을 위한 주요 십자화과 채소의 종속간의 체세포잡종기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

십자화과 채소는 지난 수십 년 동안 종속간에 필요한 형질을 옮기는 유성교잡의 방법을 성공적으로 해오고 있다. 그러나 이러한 유성교잡의 방법은 한계성이 있다. 원형질체 융합에 의한 체세포잡종식물체생산은 재래육종방법으로 불가능한 종속간의 체세포잡종식물체를 생산하여 다양하고 새로운 유전자형의 식물체를 창출할 수 있을 뿐만 아니라 신품종을 육성에 걸리는 시간을 단축시킬 수 있다. 원형질체 융합방법을 이용하여 유연 관계가 멀고 교배가 불가능한 식물체에 있는 세포질 응성불임(Cytoplasmic Male Sterility) 특성을 도입할 수 있어 F1종자생산에 이용할 수 있다.

본 연구의 목적은 특성과 유연관계가 상이한 배추, 양배추, 브로콜리, 갓 간의 원형질체융합을 통한 종간잡종을 육성하여 질적 형질 즉 내병성 내추대성 등의 각종저항성을 증대시키는 동시에 세포질 응성불임특성을 지닌 개체를 육성하는것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 국내외 각종 유전자원들을 수집 및 특성검정
2. 세포융합에 이용될 식물재료의 재 분화 체계확립
3. 원형질체 분리 융합 배양조건 구명
3. 원형질체 배양에 의한 식물체 재 분화 체계확립
4. 원형질체 융합에 의한 세포질융성불임특성 도입 및 검정
5. 잡종식물체 후대특성비교 및 내병성 개체선발
6. 원형질체 융합방법개발에 의한 잡종식물에 생산

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 유전자원 수집
-국내외의 십자화과 유전자은행과 중앙종묘(주)에서 유전자원들을 수집-유전자원의 특성조사, 검정
2. 식물체 재분화 체계확립
-원형질체융합의 공시재료로 재분화효율이 높았던 배추(kw9, kw23, CMS kw67), 양배추(kw28), 브로콜리(kw11, CMS인 kw56와 kw105), 갓 (kw68, kw69, Rapid cycling seed stock에서는 새로운 "Anand" CMS Line(CrGC4-3, CrGC5-9)이 선발됨
3. 원형질체 분리, 융합 배양 및 재분화체계확립

- 원형질체분리에 가장 적합한 효소의 농도는 1%Cellulysin과 0.5%Macerozyme 이며삼투조절제의 적정농도는 Mannitol 0.4M임
- 원형질체 융합매개로는 35-40% PEG이며
- 배양배지는 수정된 k8p 배지에 식물생장조절제첨가
- 60일후 분리된 원형질체에서 식물체 재분화됨.

4. *B. campestris* 와 *B. oleracea* 간의 체세포잡종식물체 생산 및 특성검정

(1)배추(kw9)와 브로콜리(kw11)간의 체세포잡종식물체

재분화된 식물체는 Flow cytometric 분석방법, 염색체수 관찰방법, RAPD 분석방법으로 융합여부를 검정하였고 식물체들의 원예적 특성이 비교되었으며 재분화된 개체지간에는 변이가 나타나지 않았으며 임성은 개체에 따라 다소의 차이가 있었는데 임성이 높은 개체는 후대 개체들의 형태적 변이가 임성이 낮았던 개체들 보다 상대적으로 적은 것으로 나타났음. 융합잡종 식물체에 융합에 사용한 편친을 여교잡한 후대에서도 임성이 높은 개체의 후대가 변이가 적은 것으로 나타나 융합잡종식물체가 세대를 거듭하면서 유전적 형태적으로 안정되어 감에 따라 임성이 회복되어지는 것으로 판단됨.

(2)CMS 특성을 가진 배추와 브로콜리의 체세포잡종식물체 생산

세포질용성불임특성을 가진 두가지 식물체를 이용하여 체세포잡종식물체를 생산하였음. 형태적으로 배추와 비슷하였으며 암술이 기형이었으며 수술은 꽃잎으로 변하여 용성불임개체임이 확인되었음.

(3)배추와 양배추의 체세포잡종식물체 생산 및 후대의 병저항성개체 선발

배추와 양배추의 원형질융합에서 얻어진 식물체도 배추와 브로콜리의 융합체처럼 분자생물학적, 세포학적 방법으로 체세포잡종식물체임이 확인되었

음. 체세포잡종식물체는 형태적으로 다양한 변이가 다양하고 후대에서 분리가 많이 생긴. 체세포잡종식물체의 2세대에서 흑부병저항성 개체 선발하였음. 잡종식물체의 형태의 변이폭이 넓었으며 다양하고 새로운 육종소재의 생산할수 있다는 가능성이 입증됨

5. 새로운 종류의 "Anand" 세포질 융성불임특성을 갖에로의 도입

"Anand" 세포질 융성불임특성을 지닌 체세포잡종식물체들을 생산하였으며 그들의 특성은 분자생물학적인 방법, 세포학적인 방법으로 검정이 되었음. 수술이 꽃잎으로 변하여 정상적인 화분을 생산할 수 없는 특성으로 세포질융성불임특성이 도입된 것이 확인됨. 만약 Anand 세포질 융성불임특성이 후대에서도 안전하게 발현한다면 Ogura CMS특성을 이용함으로써 십자화와 채소에서 문제가 되는 Chlorosis를 해결 할 수 있을 것으로 기대함.

6. 브로콜리의 Ogura CMS 특성을 갖에로의 도입

14개의 체세포잡종식물체를 얻었으며 얻어진 식물체는 Ogura CMS특정 primer를 사용하여 CMS특성을 검정하였는데 두 개의 식물체에서 특정 밴드가 나타나지 않았는데 식물체에서 화분이 생산되었음. 원예특성비교로부터 잡종식물체들간의 변이는 없었으며 개화된 식물체는 정상적인 암술을 가지고 있었으며 수술도 가지고 있었으나 수술에는 화분이 생산되지 않은 것으로부터 세포질융성불임을 확인함

7. Multi-fusion 방법 개발에 의한 다양하고 새로운 체세포잡종식물체 생산

Multi-fusion방법을 개발하여 배추, 브로콜리에 있는 세포질 융성불임특성을 갖에 도입하였을 뿐만 아니라 다양한 유전자형의 새로운 식물체를 창출

하였음. 체세포잡종식물체는 분자생물학적 분석방법으로 세포질 응성불임특성이 도입되었음을 확인할 수 있었으며 원예적인 특성비교로부터 형태적으로 새로운 식물체들 나타났으며 화기는 암술은 정상적인 암술로 보였고 수술은 존재하지만 화분이 생산되지 않았음. Multi-fusion 개발에 의한 체세포잡종식물체의 생산은 새로운 유전자형태를 가진 식물체를 생산할 수 있는 범위를 넓혀주었을 뿐만 아니라 세 가지 혹은 그 이상의 식물체내에 있는 유용한 형질들을 한꺼번에 이전시킬 수 있음.

SUMMARY

I . Title

Development of somatic hybridization techniques of major *Brassica* vegetables for the improvement the international competition of the seed industry

II. Objectives and Importance of the Project

Last few decades, sexual cross has been the only method for transferring important traits of inter-specific *Brassica* vegetables. But, this method has limitation in overcoming the cross barriers. To cope with this wall of transferring useful traits among Brassica vegetables, genetic engineering techniques have been recently applied to breeding programs. Genetic transformation method seemed to have very bright future for the improvement of agronomic traits in the crops, but it has caused the issue of the food stability and patents, which limit the immediate and wide utilization of this techniques. However, somatic hybridization techniques using Cell fusion (protoplast fusion) method, have provided the alternative method to transfer important traits among species in which crosses are impossible one another. This technique can produce the CMS (cytoplasmic male sterility) plants and various types of genetic resources and shorten the breeding time. The objectives of this study were to collect and evaluate the diverse *Brassica* vegetable resources, to produce somatic hybrids having various important traits such as disease resistance, bolting resistance, and cytoplasmic male sterility

and characterize these somatic hybrids based on morphological and agronomical characters, chromosome and molecular analysis. Many somatic hybrids were developed for the first time in Korea, and CMS lines in *B. juncea* and multi-fusion method in *Brassica* vegetables were developed for the first time in the world.

III. Research Scopes and perspective

1. Collection and evaluation of diverse genetic resources in Korea and abroad
2. Establishment of plant regeneration system in Brassica vegetables to be used protoplast fusion.
3. Establishment of protoplast isolation and culture
4. Establishment of plant regeneration from protoplast culture
5. Introduction and evaluation of CMS via protoplast fusion
6. Evaluation of offsprings of somatic hybrids and selection of disease resistant somatic hybrids
7. Production of somatic hybrids using protoplast fusion method

IV. Results

1. Collection and evaluation of diverse genetic resources in Korea and abroad
Collection from Choong-Ang seeds and *Brassica* gene bank in USA
Evaluation of genetic resources

2.2. Establishment of plant regeneration system in Brassica vegetables to be used protoplast fusion.

Selection of genetic materials having high regeneration ability such as Chinese cabbage (kw9, kw23, CMS kw67), Cabbage(kw28), Broccoli(kw11, CMS, kw56 and kw105), Mustard(kw68, kw69, Rapid cycling seed stock (Anand" CMS Line(CrGC4-3,CrGC5-9).

3.Establishment of protoplast isolation and culture, fusion, and plant regeneration

- Selection of best enzyme mixture (0.5%Macerozyme, 1% cellulycine) and osmoticum(Mannitol 0.4M)
- Best fusion condition was 35-40% of PEG
- Modified k8p medium added with plant growth regulators was the best
- Plant regeneration took place in 60 days after protoplast culture

4.Production and evaluation of somatic hybrids between *B.campestris* and *B.oleracea*

(1)Somatic hybrids between Chinese cabbage inbred line (kw9)and Broccoli inbred line (kw11).

Somatic hybrids have been analysed using various methods such as flow cytometric analysis, chromosome observation and PCR-RAPD, not to mention of the horticultural characters. A few variations were observed

among somatic hybrids derived from the same parents. Somatic hybrids having high fertility produced offsprings with relatively low level of variation in morphological traits. After back crossing, somatic hybrids became quite stable in their horticultural characters, recovering their fertility.

(2) Production of Somatic hybrids having CMS traits between Chinese cabbage and Broccoli

Somatic hybrids were produced, most of the somatic hybrids were very similar to Chinese cabbage in terms of their morphology, but stigma was abnormal, and anthers were sterile.

(3) Production of somatic hybrids and disease (*Xanthomonas*) resistant lines in their offsprings between Chinese cabbage and cabbage.

Various analysis methods were also applied to these somatic hybrids as mentioned previously. Somatic hybrids showed diverse morphological characters in the offsprings of the first generation. These somatic hybrids showed strong potential for producing genetically diverse resources which can be used in the breeding program for the development of new cultivars in Brassica vegetables.

5. Introduction of new type of CMS, Anand, into Mustard

Many somatic hybrids were produced having "Anand" CMS, and their

characteristics were analysed based on cytological and molecular biological methods. Abnormal anthers were developed having no fertility, indicating that these somatic hybrids were CMS. These CMS lines are in the process of back-crossing to parental lines, and will be very useful breeding materials for the development of CMS lines, having no chlorosis in the plant growth.

6. Introduction of Ogura CMS of Broccoli into Mustard

Fourteen somatic hybrids were obtained. Based on the PCR analysis using specific primer for Ogura CMS, 12 somatic hybrids were turned out to be CMS plants. No great variations were observed among somatic hybrids. These somatic hybrids seemed to be normal in their morphology, but no functional pollens were produced, indicating that they were CMS.

7. Production of new and diverse somatic hybrids based Multi-fusion method

Multi-fusion of protoplast using several different types of protoplasts of Chinese cabbage, broccoli, and mustard was developed, and these techniques were able to produce CMS lines as well as diverse genetic resources in Brassica vegetables. Development of multi-fusion gave large extension to the production of new crops with new types of genetic materials and transferring many traits at one time.

CONTENTS

Summary	2
Chapter 1 . Introduction	
Section 1. Objectives and perspectives of research	22
1.Necessities of research	22
2.Objectives and scopes of research	42
Chapter 2.Collection of <i>Brassica</i> germplasm and characterization	
Section 1. Introduction	45
Section 2. Collection of germplasm	45
1. Breeding lines and materials	46
2. Breeding of high efficiency regeneration materials	46
3. Breeding of MS materials	46
Section 3. CMS primer synthesis and screening	50
Chapter 3. Breeding lines and establishment of seed production system	
Section 1. Introduction	53
Section 2. Contents of research	54
1. Collection of germplasm for Breeding lines	54
2. Assay of germplasm	55
3. Characterization and Breeding lines of collected germplasm	55
3-1. Self-incompatible assay of chinese cabbage germplasm	55
3-2. <i>TuMV</i> resistant test of chinese cabbage and mustard	56
3-2. <i>Croop root</i> resistant test of chinese cabbage, mustard and cabbage	57

3-3. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> resistant of cabbage	58
3-4. <i>Plutella xylostella</i> resistant test of cabbage	58
3-5. Breeding lines of anther culture	59

Chapter 4. Plant regeneration and protoplast isolation

Section 1. Establishment of plant regeneration system	87
1. Effect of plant growth regulator on plant regeneration	87
2. Influence of AgNO ₃ on plant regeneration	89
3. Plant regeneration depend on Genotype	91
4. Plant regeneration using by plant tissue leaf	92
Section 2. Protoplast isolation and inquiry of culture condition	96
1. Protoplast isolation	96
2. Purification and culture of protoplast	100
3. Protoplast culture	101
4. Plant regeneration from callus	104

Chapter 5. Protoplast fusion and selection of somatic hybrid

Section 1. Introduction	106
Section 2. Establishment of protoplast fusion system	107
Section 3. Selection of somatic hybrid	108

Chapter 6. Production of somatic hybrid plant between chinese cabbage (*B.campestris*) and broccoli(*B.oleracea*)

Section 1. Introduction	111
Section 2. Production of somatic hybrid plant between <i>B.campestris</i> and	

<i>B.oleracea</i>	14
1. Introduction	114
2. Materials and isolation, fusion, culture methods of protoplasts	115
3. Fusion screening using by RAPD methods	116
4. Identification of somatic hybrid plant using by Flow cytometry analysis	117
5. Fusion screening using by morphologic comparison	121
6. Characterization of hybrid depend on bolting and flowering habits	122
7. Fertility test using by pollen germinability test	124
8. Maintenance and proliferation of progeny of hybrid plant	125
9. Establishment of seed harvesting system	127
 Section 3. Production of hybrid plant between <i>B.campestris</i> (chinese cabbage with CMS) and <i>B.oleracea</i> (broccoli with CMS)	129
1. Materials and methods	129
2. Plant regeneration	129
 Chapter 7. Production of somatic hybrid plant between <i>B.campestris</i>(Chinese cabbage) and <i>B.oleracea</i>(Cabbage) using by cell fusion methods and selection of <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> resistant in progeny	
Section 1. Introduction	131
Section 2. Isolation and culture of protoplasts	133
1. Materials and methods	133

2. Isolation , fusion and culture of protoplasts	133
Section 3. Ploidy level assay with Flow cytometry	135
Section 4. Chromosomes observation and genomic in situ	139
1. Chromosomes observation	139
2. Genomic in situ hybridization	140
Section 5. Morphology observation of somatic hybrids	145
Section 6. Comparision of flowering, bolting habits	146
Section 7. Characteristic of the progeny 1 generation of the somatic hybrids	148
Section 8. Characteristic of the progeny 2 generation of the somatic hybrids	155
Section 9. Detection of <i>Xanthamonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> resistant in somatic hybrids	156
Section 10. Establishment of seed production system	158

Chapter 8. Introduction of CMS traits into mustard by protoplast fusion method

Section 1. Introduction	159
Section 2. Introduction of CMS characteristics of <i>B.rapa</i> to mustard	161
1. Materials and seed sterilization	161
2. Protoplast isolation , fusion, culture	162
3. Molecular analysis	163
4. Cytological analysis	164
5. Morphological characteriztion	165
6. Results	165

Section 3. Introduction of CMS characteristics of <i>B.oleracea</i> to <i>B.juncea</i>	171
1. Protoplast isolation, fusion & culture and plant regeneration	171
2. Identification of CMS traits using PCR methods by Ogura CMS specific primers	172
3. Southern hybridization	174
4. Identification of somatic hybrids by chromosome counting	174
5. Morphological characteristics of somatic hybrids and parents	175
6. Comparison of bolting in somatic hybrids	177

Chapter 9. Introduction of CMS traits into mustard by Multi-fusion method

Section 1. Introduction	179
Section 2. Materials and methods	181
1. Materials and seed sterilization	181
2. Protoplast isolation, fusion and culture	181
3. Molecular analysis	183
4. Cytological analysis	184
Section 3. Results and discussion	185
1. Protoplast division and plant regeneration from callus	185
2. Identification of CMS traits in regenerated plants using PCR	187
3. Southern blot hybridization	189
4. Chromosomes counting	190
5. Acclimation in pot and morphological comparison	191
6. Comparison of bolting and flowering	197
Section 4. Future prospect	198
Referance	200

목 차

요 약 문	2
제 1 장 서 론	
제1절 연구개발의 목적과 범위	22
1. 연구개발의 필요성	22
2. 연구 개발 목표 및 내용	42
제 2 장 십자화와 유전자원 수집 및 특성검정	
제 1 절 서 설	45
제 2 절 유전자원수집	45
1. 계통 및 기본재료의 육성	46
2. 재분화율이 높은 재료육성	46
3. MS 재료육성	46
제 3 절 CMS primer 합성 및 응성불임 개체의 확인	50
제 3 장 계통육성 및 채종체계 확립	
제 1 절 서 설	53
제 2 절 연구내용	54
1. 계통육성을 위한 유전자원의 수집	54
2. 유전자원 검정	55
3. 수집 유전자원 특성검정 및 계통육성	55
가. 배추 유전자원의 자가불화합성 검정	55
나. 배추와 갓의 TuMV 저항성 검정	56
다. 배추, 갓, 양배추의 무사마귀병 저항성 검정	57

라. 양배추의 흑부병 저항성 검정	58
마. 양배추의 즙나방 저항성 검정	58
사. 약배양을 통한 계통육성	59

제 4 장 식물체 재분화 및 원형질체 분리조건

제 1 절 식물체 재분화 체계확립	87
1. 식물생장조절제가 식물체 재분화에 미치는 효과	87
2. AgNO ₃ 의 처리가 식물에 재분화에 주는 영향	89
3. Genotype에 따른 식물체 재분화	91
4. 식물체 본엽을 이용한 식물체 재분화	92
제 2 절 원형질체 분리 및 배양조건 구명	96
1. 원형질체 분리	96
2. 원형질체의 정제와 배양	100
3. 원형질체의 배양	101
4. 캘러스로부터 식물체 재분화	104

제 5 장 원형질체 융합 및 체세포 잡종 식물체 선발

제 1 절 서 설	106
제 2 절 원형질체 융합체계 확립	107
제 3 절 체세포잡종식물체의 선발	108

제 6 장 배추와(*B. campestris*) 와 브로콜리(*B. oleracea*)의

체세포잡종 식물체 생산

제 1 절 서 설	111
제 2 절 <i>B. campestris</i> (배추) 와 <i>B. oleracea</i> 간의 체세포잡종식물생산 ..	114

1. 서론	114
2. 실험재료 및 원형질체 분리, 융합, 배양방법	115
3. RAPD 방법에 의한 융합여부의 검정	116
4. Flow cytometry 분석에 의한 체세포잡종식물체 확인	117
5. 형태적 비교에 의한 융합여부의 검정	121
6. 추대, 개화 습성에 따른 융합체의 특성	122
7. 화분발아력 실험에 의한 임성검정	124
8. 잡종 식물체 후대의 유지 및 증식	125
9. 체종체계 확립	127
제 3 절 <i>B. campestris</i> (CMS인 chinese cabbage)와 <i>B. oleracea</i> (CMS인 브로콜리)의 잡종식물체 생산	129
1. 재료 및 방법	129
.....	129
2. 식물체 재분화	129
제 7 장 세포융합방법을 이용한 <i>B. campestris</i> (Chinese cabbage)와 <i>B. oleracea</i> (Cabbage)간의 체세포잡종식물체 생산 및 후대에서 검은뿌리 썩음병(<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>)저항성 선발	
제 1 절 서 설	131
제 2 절 원형질체 분리 및 배양	133
1. 재료 및 방법	133
2. 원형질체 분리 융합 및 배양	133
제 3 절 Flow cytometry 분석 방법에 의한 배수성검정	135

제 4 절	염색체수 관찰 및 genomis in situ	139
1.	염색체수 관찰	139
2.	Genomic in situ hybridization	140
제 5 절	체세포잡종식물체의 형태적 비교	145
제 6 절	개화, 추대숙성 비교	146
제 7 절	체세포잡종식물체의 교배후대1세대 의 특성	148
제 8 절	체세포잡종식물체의 교배2세대의 특성	155
제 9 절	잡종식물체의 흑부병 저항성 검정	156
제 10 절	체종체계 확립	158
제 8 장	세포융합방법을 이용한 세포질웅성 불임 특성을 갖으로 도입	
제 1 절	서 설	159
제 2 절	<i>B. rapa</i> 의 세포질 웅성불임특성을 갖에 도입	161
1.	실험 재료 및 종자 소독	161
2.	원형질체 분리, 융합 및 배양	162
3.	분자생물학적 분석	163
4.	세포학적 분석	164
5.	형태적 특성조사	165
6.	결과	165
제 3 절	<i>B. oleracea</i> 의 세포질 웅성불임특성을 <i>B. juncea</i> 에 도입	171
1.	원형질체 분리, 융합, 배양 및 식물체 재분화	171
2.	Ogura CMS 특정 primer를 이용한 PCR 방법에 의한 재분화된 식물체의 세포질 웅성불임특성검정	172
3.	Southern hybridization 방법에 의한 세포질웅성 불임특성검정	174

4. 염색체수 관찰에 의한 융합여부의 확인	174
5. 융합체와 모본들의 형태적인 비교	175
6. 추대양상에 의한 융합체의 비교	177

제 9 장 Multi-fusion 방법 개발에 의한 세포질 융성불임특성을

갖으로 도입

제 1 절 서 설	179
제 2 절 재료 및 방법	181
1. 실험 재료 및 종자 소독	181
2. 원형질체 분리, 융합 및 배양	181
3. 분자생물학적 분석	183
4. 세포학적 분석	184
.....	184
제 3 절 결과 및 고찰	185
1. 원형질체 분열 및 캘러스로부터 식물체 재분화	185
2. PCR 방법에 의한 재분화된 식물체들의 세포질융성불임특성검정 ..	187
3. Southern blot hybridization 방법에 의한 검정	189
4. 염색체 관찰에 의한 융합여부	190
5. 포트에 순화 및 형태적인 비교	191
6. 추대성 및 개화습성 비교	197
제 4 절 채종체계확립 및 기대효과	198
참고문헌	200

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 필요성

80년대 하반기 우리 나라 경제는 3低의 호황을 구가하면서 대외적으로 괄목할 만한 성장을 이룩하였으나, 우리 농업구조의 취약한 구조는 공업화의 그늘에 가려 미처 대외경쟁력을 갖추기도 전에 세계경제 전면에서 허약한 모습으로 노출되어 세계 선진각국으로부터 공격의 표적이 되어 왔다. 90년대 들어서에는 더욱 강도를 높이는 선진국들의 농수산물 수입 개방압력에 어쩔 수없이 GATT체제하에서 농산물 수출시장 개방을 하지 않을 수 없게 되었다.

WTO 체제 출범에 근본적으로 대처하는 길은 국내농업을 신속히 기술집약적이며 고부가가치를 지닌 산업으로 전환하고 육성하는 것이다. 농림수산부에서 주최한 첨단농림수산물기술 개발계획 공청회에서 밝혔듯이 기술개발 우선 1 순위 분야는 원예산업 분야이다. 특히 국민의 식생활과 가장 많은 관련을 맺고있는 채소작물의 신품종 개발분야이다. 세계 채소류 수급동향을 볼 것 같으면 감자를 제외한 세계 채소류 총 생산량은 426.2백만 톤으로 과일생산량 333.6백만 톤보다 많으며, 아시아주의 생산량이 238.9백만 톤으로 가장 많고 유럽 (70 백만 톤), 북미(36.8백만 톤), 구소련 (33.8백만 톤), 아프리카(30.8백만 톤), 남미, 오세아니아순이다(농수산물유통공사, 1992.12).

1955년부터 1994년까지 국내 채소생산량은 1994년에 가뭄으로 생산량이

전년도에 비해서 약간 감소한 것을 제외하고는 매년 생산량이 증가하고 있다 (표1). 1994년 재배면적은 1955년의 면적에 비해 3배정도 늘었으나, 생산량은 9배나 많아진 것을 볼 때 종묘산업의 활성화로 육성된 신품종의 결과로 얻어졌다고 볼 수 있다. 앞으로도 종묘산업의 건전한 발전 없이는 국가의 자주적인 농업발전이란 기대할 수 없을 것으로 생각된다.

표 1. 1955-1994까지의 국내 채소생산면적 및 생산량

연도	면적	생산량	연도	면적	생산량
1955	107,722	1,166,255	1988	355,797	7,651,241
1960	117,607	1,088,734	1989	319,452	8,314,148
1964	150,637	1,575,945	1990	316,604	8,667,439
1970	258,006	2,653,253	1991	347,289	8,608,672
1975	250,109	4,767,371	1992	356,118	8,790,787
1980	377,142	7,755,938	1993	378,318	10,151,781
1985	356,815	7,763,046	1994	337,046	9,222,132

(면적: ha, 생산량: M/T). (참고문헌: 1994 채소생산실적. 1995. 농림수산부)

채소류 중에서도 무, 배추, 양배추, 브러컬리, 유채등이 속해있는 십자화과 채소류는 우리나라는 물론 세계적으로 가장 중요한 엽채류로 취급된다. 특히 국내에서는 이러한 십자화과 채소류는 김치등의 재료로 중요하게 다루어지고 있을 뿐만 아니라 종자및 김치의 해외수출을 통해서 외화 획득원으로서의 중요한 위치를 차지하고 다 (표 2).

표 2. 종자수출입 규모와 금액

년 도	구 분		종자량(리터)	금액(1000/\$)
1990	수입	무	213	1
		배 추	-	-
		양배추	2,963	369
		기 타	508,669	2,644
		소 계	511,836	3,028
	수출	무	211,299	3,577
		배 추	55,808	794
		양배추	3,289	28
		기 타	75,717	1,674
		소 계	346,113	6,095
1994	수입	무	761,886	1,602,937
		배 추	28,276	207,166
		양배추	15,221	769,899
		기 타	1,775,660	15,180,938
		소 계	2,581,043	17,758,940
	수출	무	194,143	3,745,329
		배 추	53,654	1,415,954
		양배추	2590	189,590
		소 계	385,736	6,412,809

(95' 종묘협회)

특히 무, 배추는 국내에서는 없어서는 안 되는 중요작물이면서도 외국으로 매년 100만불 이상 종자를 수출하고 있는 경제성이 높은 작물이다(표 2).

최근 들어서 특히 십자화와 채소의 해외 채종량이 높아감에 따라 종자의 수출입 량도 매년 증가하는 추세에 있다. 1970-1990 년 사이의 종자 수입과 수출량과 금액을 비교해보면 무 (69.3%), 배추 (7.6%), 양배추(0.4%)로 주로 십자화와 채소가 주종을 이룬다 (채소 수출 산업육성연구, 농촌진흥청, 1994).

표2 에서 보여주는 것과 같이 1990 년도와 1994 년도를 비교해 보면 1990 년도에는 전체 종자의 수입량보다는 수출량이 적었지만, 십자화와 채소인 무, 배추, 양배추의 경우는 수출량이 훨씬 많았다. 그러나 1994 년도에는 총수입된 종자량은 수출량보다 6.7 배 정도 많았다. 즉, 십자화와 채소는 배추만 빼고 무와 양배추는 수입량이 수출량보다 훨씬 많았을 나타내고 있다. 국내의 십자화와 육종 수준이 세계적이라고 하지만 배추에서만 우위를 점하고 있지 무 같은 경우만 해도 일본에 많이 뒤지기 때문에 수입을 많이 하는 것으로 생각되어 진다.

표3. 배추종자수출입 규모

연도	구 분	종자량 (리터)	금액 (\$)
1990	수입	-	-
	수출	55,807	794
1992	수입	1,041	83,532
	수출	80,652	1,786,580
1993	수입	30,628	96,069
	수출	36,436	1,164,872
1994	수입	28,276	209,166
	수출	53,654	1,415,954

(1995 년 종묘협회 제공)

* 국내종묘회사가 해외에서 채종하여 국내로 다시 들어온 것도 포함함.

그러나 아직까지 무와 배추에 있어서는 가격면에서 우위를 점유하고 있지만 (표 2-3), 이런 식으로 계속 간다면 배추의 우위성도 잃어버릴지도 모르는 일이다. 모든 작물에 집중적인 투자를 할 수는 없기때문에 국가경쟁력이 있는 십자화과채소, 특히 배추에 산. 학 이 협력해서 첨단농업을 수행해야 한다.

종자를 가장 많이 수출하는 미국은 한국시장을 공략하기 위해서 캘리포니아주를 비롯한 미국의 몇몇 지역에 한국사람의 기호에 맞는 쌀, 사과, 배 품종을 만들고 있고, 심지어는 배추에 대한 연구를 수행하고 있다고 한다. 따라서 우리나라 종묘산업의 건전한 장기적인 발전대책 수립이 국가적 차원에서 이뤄져야 한다고 생각된다.

표 4. 1967-1994 년까지의 국내 주요 채소 종자 생산량

연도별	무	배추	고추	기타	계
1967	162,240	142,275	1,056	64,644	370,215
1970	181,213	161,170	492	67,400	410,281
1975	414,669	162,290	12,426	174,108	763,495
1980	906,384	354,909	18,208	508,024	1,787,525
1985	1,158,918	334,250	49,391	463,963	2,006,522
1990	1,149,720	273,792	48,900	412,363	1,884,775
1991	1,136,147	259,108	57,680	411,178	1,864,113
1992	1,714,376	508,103	73,283	671,966	2,967,728
1993	31,154,456	347,657	130,872	756,340	2,389,325
1994	1,305,746	270,664	97,419	642,997	2,316,826

단위: 리터. (1995 년 종묘협회 제공)

1967 년에서 1994 년 까지 국내 주요 채소류의 종자생산량 중 대부분을 십자화과 채소가 차지하고 있음을 알 수 있다. 그 중에서 무 와 배추는 우리나라의 주요채소중 하나인 고추에 비해서도 몇배의 종자생산량을 보여주고 있다 (표 4). 우리의 십자화과채소류의 육종기술은 세계적인 수준임은 등록된 품종수를 보면 쉽게 알 수 있다 (표 5).

표 5. 국내 품종등록 현황 (1994. 12. 31)

구 분	고 정 종		교배종 품종수	계	
	품종수	등록점수		총품종수	총등록점수
무	19	145	280	299	425
배 추	6	26	228	234	254
양배추	-	-	16	16	16
기 타	42	327	772	819	1.099
계	72	498	1.296	1.368	1.794

양배추를 비롯한 브러컬리, 컬리플라워등의 십자화과 양채류의 자체개발 품종은 없는 실정이라, 대부분 수입에 의존하고 있다. 그 중에서도 양배추의 경우는 육성한 것이 몇 품종 안되지만 양배추의 종자수입은 매년증가하고 있는 추세인데, 특히 1991 년의 경우 태풍피해로 인한 급증이 있었다. 1988 년까지는 대만이 주요 수입선이었으나, 1989 년 이후 미국이 최대 수입선이 되었다. 채소종자는 채종하는데 드는 비용이 많기 때문에 최근에 들어서 인건비가싼 동남아 지역등에서 해외 채종량이 매년 증가하고 있다. 이에 따른 순수입도 커지고 있다 (표 6).

표 6. 채소종자 해외 채종량

구분	1991		1993		1994	
	순수입	해외채종	순수입	해외채종	순수익	해외채종
전체	794,563	222,707	509,250	1,853,000	1,136,709	1,444,334
무	445	163,741	18,155	1,255,426	146,338	615,548
배추	-	-	623	30,005	910	27,366
고추	-	-	-	32,164	-	234,474

(자료: 1995 한국종묘협회)

앞으로도 계속해서 해외채종량이 늘어갈 것으로 생각된다. 1908년 옥수수에서 처음으로 F1 품종이 도입되면서 선진국의 경우 대부분의 종자는 F1으로 판매되고 있다. 일본 같은 경우 대부분의 종자는 F1 교잡종으로 팔리고 있지만, 후진국일수록 F1 교잡종을 이용하는 비율이 낮다 (표 7). 이러한 이유중 하나는 육종체계, 특히 옹성불임이나 자가불화합성을 이용하는 채종체계가 되어있지 않기 때문이다. 또한 선진국의 값비싼 F1 종자를 살 여유가 없거나, 채소값이 너무싸거나 고품질의 채소에 대한 선호도가 낮기 때문에 구태여 비싼 외국 종자를 사다 농사 지을 필요성이 없기 때문이다.

표 7. 아세아 몇 나라의 채소 재배면적과 F1 종자 파종을

		중국	일본	한국	태국	필리핀	인도
채소재배면적(1000ha)		-	400	350	300	130	-
총생산량(Kg)		119,786	13,737	9,938	2,518	4,338	4,722
평균수량(T/ha)		-	30	20	7	6	-
F1파종율 (%)	배추	80	99	90	60	80	-
	양배추	90	100	100	85	75	21
	무	-	95	85	10	-	-

(중앙종묘 제공)

F1 교잡종이 비싼이유중 하나는 자가불화합성이나 옹성불임을 이용하지 못할 경우 교배조합 식물체마다 교배를 한 다음 채종을 해야하는데 대부분의 채소꽃은 작아서 교배하는데 많은 시간을 요한다. 따라서 인건비가 많이들기 때문에 인건비가 싼 동남아로 진출하는 이유도 여기에있다. 양배추같이 자가불화성이 약한 작물의 경우 옹성불임개체를 이용만 할 수 있다면 중국, 인도네시아, 말레이시아 등을 비롯한 동남아 국가는 물론 선진국으로도 싼 가격으로 수출을 할 수 있을 것이다. 무 와 배추가 자가불화합성이 다소 강하다고 하더라도 자가수분율이 많을 때는 20% 까지 되므로 옹성불임성 개체를 이용한다면 지금보다 더 싼 가격으로 종자를 팔 수 있기 때문에 세계 종묘산업에 미치는 영향은 상상할 수도 없을 정도이다.

용성불임성 개체를 이용하면 100% F1 잡종식물체를 얻을 수 있기 때문에 종묘분쟁의 소지가 거의 없어질 것이다. 따라서 순도검정에 들어가는 막대한 비용도 줄어들 것이다. 순도검정에서 off-type 이 많이 나올 경우 몇억을 들여 채종한 종자를 버리는 일이 없을 것이다. 이렇게 종자를 버리는 게 종묘분쟁시 농민들에게 보상해야하는 더 큰 어려움을 막을 수 있다. 이러한 종묘분쟁이 일어나면 보상차원에서가 아니라 한 종묘회사의 신용과 관련된 매우 민감한 문제이다. 만약 이러한 문제가 다른 나라의 농민들 사이에 발생했다면 종자를 수입한 업체에 막대한 손해를 끼치게되어 한 회사의 문제가 아니라 우리 나라 종묘업계의 신용과 관련된 문제라 신중히 생각하지 않을 수 없다.

용성불임성을 이용한 채종의 효율성을 높이는 것 외에도 내병성, 추대역제성 채소 종자를 개발하는 것도 중요한 일이다. 일단 우수한 형질을 지닌 품종을 만든 다음에 F1 생산체계를 세우게 된다. 지금까지 기술한 바와 같이 십자화와 채소가 우리나라 종묘업계에 미치는 영향이 지대하다는 것을 알 수 있다. 동남아 시장 뿐만 아니라 선진국의 종자시장을 개척하기 위해서도 내병성, 내 추대성의 우수한 형질을 지니면서 용성불임을 지닌 품종의 개발을 서둘러야 하겠다.

십자화와 채소는 그 수요의 증가와 더불어, 전통적인 육종방법에 의하여 질과 양적인 측면에서 계속적으로 개량되어왔다. 그러나 전통적인 육종방법은 그 한계성에 도달하였으며 새로운 육종방법에 의한 신품종의 육성이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 최근에 첨단농업을 위한 도구로 쓰이는 원형질체융합기술을 십자화와채소에 효과적으로 이용이 가능하다. 따라서 본 연구의 목적은 특성과 유연관계가 상이한 배추, 무, 양배추, 케일 간의 원형질체융합을 통한 중간잡종을 육성해서 질적형질, 즉 내병성, 내추대성 등의 각종 저항성을 증대시키는 동시에 용성불임성을 지닌 개체를 육종하고

자 한다.

1) 기술적 측면:

식물육종의 주된 목적은 새로운 유전자형을 지닌 신품종을 만들어 내는 것이다. 가장 손쉬운 방법은 같은 종내에 존재하는 유전변이성을 찾아서 교배를 통해 유용한 형질을 원하는 품종 또는 육종계통으로 옮기는 것이다. 따라서 육종에 이용 될 다양한 육종소재를 만드는 것이 품종육성에 가장 중요한 단계라고 할 수 있다.

육종에 이용 할 수 있는 유전 육종소재를 다양하게 하는 방법으로 종간 또는 속간교배를 통한 새로운 유전자형을 창출하는 것이다. 일반적으로 식물 종속간 잡종의 경우 서로간의 불화합성 때문에 잡종 식물체를 얻기가 어렵다. 간혹 배 또는 배주배양을 통해서 식물체를 살린다고 하더라도 불임일 확률이 높기에 육종 소재로의 이용이 어렵다.

최근 종묘에 관계된 조직배양, 세포융합들의 식물공학은 급속히 발전되고 있다. 일본 농림수산성 농업생물자원연구소가 관계시험연구 기관의 협력을 얻어 매년 취합하고 있는 “ 식물세포 육종기술의 발전현황” 에서 십자화과채소의 경우 원형질체배양 및 융합에 관한 연구가 활발하게 이뤄지고 있다. 또한 일본 과학기술청이 5개년 단위로 행하고 있는 기술예측조사중 1987년 9월에 행한 예측에는 세포융합 기술의 실현시기를 1998 년으로 보고 있다 (표 8).

표 8. 일본의 채소개량에 있어서 생명공학의 활용 주요 사례

방법	종류	품종명칭	개시일	육성자	고찰	
배배배	양배추와배추의교잡배를 배양해 생긴 '하쿠란'을 친계통으로 한 F ₁ 품종	하쿠란	green	84.9	농업시험장	
	양순무와 양배추의 교잡배를 배양해 생긴 식물체로부터 선발	쓰게나		87.11	기린맥주 도끼다종묘	
조직배양	3배체불임주를 조직배양으로 대량증식	수박	기미와블 씨드레스	87.9	기린맥주 (주)미카도	
	웅성불임친주를 조직배양으로 대량증식하여 F ₁ 육성	파		87.3	기린맥주 도끼다종묘	
배양	micro tube의 배양	감자	농립1호 남, 맥킨	87.11	기린맥주	
	인공종자의 개발	상치 브로 콜리		88.6	기린맥주 PLANT GENETICS	
세계포용선합	다른 십자화과내 종의 원형질체융합 (웅성불임계통의 protoplast에 자외선을 조사한 것과 다른 protoplast를 융합시켜 육성)	십자 화과		87.7	식물공학연	배추x양배추
				87.8	채소. 채소 시험장	양배추x순무
				87.10	농시	가부x양배추
				85.7	다끼이종묘	양배추x배추
				87.11	사까다종묘	무x 양배추 배추x양배추

자료 : 일본농립통계 회. 1988. 종묘산업의 장래 비전

십자화과 채소의 경우 지난 수십년동안 종속간에 필요한 형질을 옮기는 유성 잡종 방법을 성공적으로 시도해 오고 있다. 그러나 속간 교잡의 경우 교배 조합에 따라서 임성의 식물체를 얻기가 쉽지 않기 때문에 선진국의 경우 원형질체 융합을 통한 신품종 육성에 많은 연구를 수행하고 있다.

특히 한쪽 양친의 핵계놈의 일부를 제거한 다음 다른 양친의 원형질체와 융합하는 비대칭 융합 (Asymmetric fusion) 방법은 기존의 원형질체 융합의 단점을 획기적으로 보완하면서 원형질체 융합에 의한 새로운 육종 소재 개발에 큰 공헌을 해 오고 있다.

1994년에는 비대칭융합법으로 담배와 당근 사이에 잡종 식물체를 만들었다. 본 과제의 연구책임자는 스웨덴의 읍살라대학교와 공동연구로 인삼과 당근 사이에서 잡종 식물체를 비대칭 융합을 통해 얻은 바 있다. 또한 그곳에서 원형질체융합의 세계적인 학자들과 같이 감자, 딸기, 십자화과 채소의 원형질체 융합에 관한 실험을 수행하면서 많은 기술을 얻었다.

표 9. 1997 년 1 월 현재 십자화과 채소에 융성불임성을 이용하는 경우

식물종	융성불임성양상	국가	개발방법	비고
유채	세포질융성불임	프랑스	원형질체융합	실용화
유채	세포질융성불임	스웨덴	상동	실용화
양배추	세포질융성불임	미국	상동	포장실험단계
갓	세포질융성불임	인도	상동	식물체확인단계

* 프랑스와 미국팀의 경우 관련학자와 직접대화를 통해서 확인했고, 갓의 경우 1995 년 9월호 Theoretical and applied genetics 학술지에 실린 내용참조. 1996 년 11월에 미국 코넬대학교를 방문하여 관련된 정보를 수집하였다.

표10. 원형질체 융합에 의한 내병성, 내제초성, 내환경성, 내추대성
계통육성의 예

특성	융합조합	비고
저항성	<i>B. napus</i> x <i>B. nigra</i>	<i>B. nigra</i> , <i>carinata</i> , <i>juncea</i>
	<i>B. napus</i> x <i>B. carinata</i>	에 있는 포마린감에 대한
	<i>B. napus</i> x <i>B. juncea</i>	저항성이 유체로 도입
내제초성	<i>B. napus</i> x <i>B. napus</i>	Atrazine 저항성 도입
내추대성	Chinease cabbage x Cabbage	개화기 변화, 추대연기, 무추대 식물체 얻음
Clubroot	<i>Raphanus sativa</i> x <i>B. oleracea</i>	Clubroot에 강한 무 형질 <i>B. oleracea</i> 로 도입
내건성	<i>B. napus</i> x <i>Eruca sativa</i>	<i>Eruca sativa</i> 내건성형질 도입

십자화과 식물의 경우 선진국에서는 이미 비대칭원형질체 융합을 통해서 세포질웅성불임성 (Cytoplasmic male sterility, CMS), 제초제 (Atrazin) 저항성, 내병성, 내충성등의 식물체를 육성하는 단계에 와 있다 (표 9-10). 이러한 연구들은 대부분 유럽 (스웨덴, 독일), 미국, 캐나다, 일본을 중심으로 이뤄지고 있지만, 대부분의 연구들은 유체를 중심으로 이뤄졌다.

최근에 인도에서도 갓에서 웅성불임을 도입해서 성공했다고 보고했고, 프랑스는 이미 오래전에 유체에 도입해서 안정적으로 육종을 하고 있다. 미국은 양배추에 도입해서 현재 시험재배 중이라고 했다. 일본도 이미 10 년 전에 시작해서 종묘회사에서는 이용하고 있다는 말이 나오고 있다. 그러면 우리는 지금시작해서 너무 늦지는 않을까 ?. 하는 우려도 할 수 있겠지만,

지금까지 밝혀진 실험방법을 이용하게 된다면 5년안에 육성불임성을 지닌 교배친을 만들어 낼 수 있을 것이다.

우리 나라는 전통적인 십자화과 채소 육종에 대해서는 다른 나라보다 앞서기 때문에, 국내에서 많이 재배되고 있는 배추를 비롯한 다른 십자화과 채소에 원형질체 융합 기술을 이용해서 우수한 육종 소재를 더 많이 만들 수 있다면 신품종 육성의 가능성도 높을 뿐 만 아니라 신품종 육성에 걸리는 시간도 많이 단축시킬 수 있다. 우리도 이 분야에 집중적으로 연구할 필요성이 있기 때문에, 본 과제가 산학 협동으로 수행되어야 할 필요성이 많다고 믿는다.

2) 경제.산업적 측면:

현재 국내 종자 시장 규모는 200-300 억대로 추산되며 2000년대의 세계 종자 시장 규모는 약 2,000억불로 예측되고 있는데 국내 종자 시장 매출액의 대부분을 차지하고 있는 5대 종묘 회사는 국내 종자 시장이 한정되어 있으므로 중국, 동남아를 비롯한 유럽의 종자 시장에 진출하고 있으며 특히 십자화과 채소는 우리 나라의 우수한 육종 기술로 해외 시장개척에 주도적 역할을 담당하고 있다.

종자수출을 가장 많이 하고 있는 미국은 86년 1억 3천만불, 그 다음인 일본은 87년 2,700 만불, EC 국가들도 1,900 만불이고 한국은 90년에 600만 불로 (십자화과 채소가 대부분) 전세계 채소종자 시장 점유율이 4-5% 로 비교적 높다고 하겠다. 따라서 우리의 채소종자 수출증진 가능성은 앞으로 매우 높다고 생각된다.

그러나 선진국에서도 최근에 십자화과 채소에 대한 연구가 활발하게 진행됨으로써 우리의 아성을 곧 무너뜨릴 태세에 있는 것도 사실이다. 특히

유전 공학 기술을 이용한 내병성, 내제초성등의 신품종 육성에 많은 인력과 연구비를 투자하고 있다. 따라서 우리도 재래적인 육종 방법에만 의존하는 안일한 생각에서 빨리 벗어나 새로운 기술을 이용한 신품종 개발을 한다면, 우리 나라 종묘 산업을 세계적인 수준으로 올리는 계기를 마련될 것이며, 잠재 성장 능력이 매우 높은 중국, 동남아 시장의 다양한 십자화과 채소의 경우 세포질용성불임성을 도입한 (교배종) 품종의 육성이 이뤄진다면 우리 나라 종묘 산업에 획기적으로 공헌하게 될 것이다. 결국은 이러한 기술개발이 국가경제 발전에 큰 기여할 것이므로 십자화과 채소에 대해서는 우위를 지키기 위한 연구가 국가적 차원에서 전폭적인 지원 하에 행해져야 할 필요성이 절실히 요구된다.

3) 사회.문화적 측면:

“한알의 종자가 세계를 바꾼다” 는 명구가 대변하듯이 우수한 새품종을 육성할 수 있는 육종능력은 한 나라의 국력의 척도가 될 것이며 국제사회에서의 위상을 결정하는 중요한 요인이 될 것이다.

작물의 생산성 향상이라는 측면에서 유전 공학이 농업에 이용되는 방법은 크게 두가지로 나눌 수 있다. 첫번째는 알고 있는 유용한 유전자를 클로닝해서 *Agrobacterium spp.* 이나 기타 다른 방법을 이용한 식물 형질 전환 방법이다. 전 세계적으로 많은 작물에 이 방법이 널리 이용되고 있다. 형질 전환 식물체를 선발하기 위해서 표식자로 넣어 주는 카아나마이신 같은 항생 물질을 만드는 유전자 등을 삽입한다. 이러한 외래 유전자들 때문에 소비자 들은 유전 공학으로 만든 원예작물을 사기를 꺼리는 경우가 많다. 또한 저항성유전자 같은 외래 유전자를 식물체에 도입할 경우 형질 전환된 식물체가 야생에 존재하는 유사 종의 잡초와 잡종이 이뤄져 유전자의 이동 현상이 일

어는 위험성이 있기 때문에 아직까지 많은 규제가 따르고 있다. 몇일전 독일의 한 과학자에서 온 편지내용에 의하면 형질전환식물체를 시험제배하고 있는 포장에 모두 반 유전공학자들에 의해서 파괴가 되었다고 한다. 형질전환에 의한 신품종 육성은 국민들의 정서가 받아들여질 때까지 시간이 걸릴 것으로 생각되어진다. 또 다른 농업 유전 공학적 방법은 본 과제에서 집중적으로 할 세포 융합에 의한 잡종 식물체 생산이다. 원형질체 (세포) 융합 방법은 잡종 식물체 선발을 위해서 항생제 저항성 유전자를 도입하지 않기 때문에 재래적인 육종 방법에서 약간 진보된 단계라고 볼 수 있다. 세포(원형질체) 융합에 의해서 감자와 토마토의 잡종인 포마토라는 식물을 처음으로 발표하면서 많은 기대를 했지만 원하는 만큼의 결과를 얻지 못해서 많은 실험실에서 포기한 상태이다. 하지만 1994 년에 네덜란드의 와게닝겐 농과 대학교 식물 육종 학과에서는 반수체감자 (*Solanum tuberosum* $2n=2x=24$) 와 토마토 (*Lycopersicon esculentum* $2n=2x=24$)를 원형질체 융합을 한 후 얻은 잡종 식물체를 몇몇 감자 품종에 역교배 (BC_1 , BC_2)를 해서 대부분 감자 형질에 토마토 형질을 지닌 잡종 식물체를 만드는데 성공했다 (제 4차 국제 감자 분자생물학 심포지움, 와게닝겐 95. 7.3-7). 십자화과 식물의 경우도 선진국에서는 이미 세포 융합을 통해서 세포질용성불임 이나 제초제 저항성 식물체를 육성하는데 많이 이용되고 있다. 이러한 정서적으로 좋은 면에서의 식물 유전 공학 업적은 유전 공학에 대해서 알레르기 반응을 보이는 학자나 일반 서민들에게 좋은 인상을 주게 될 것이다.

이러한 농업 유전 공학 기술은 앞으로 국민의 의식주를 비롯해 국민 정서에 많은 영향을 미칠 것이다. 농업 개방화에 따른 국제 경쟁력 재고에 있어서 고품질 농산물의 생산은 절대적이다. 또한 기업농이 증대되고 있는 시점에서 고품질 채소에 대한 종자 생산이 시급하다. 따라서 세포 융합 기술을 이용한 십자화과 채소의 육종 소재를 통한 신품종 육성은 국민의 식생활에

큰 영향을 줄 뿐 만 아니라 병충해 등의 열악한 환경에서 수량의 불안정에 의한 가격 파동을 줄일 수 있기 때문에 국민 정서에 좋은 영향을 미칠 것이다.

본 연구가 사회, 문화적인 측면에서 또 다른 중요한 의미를 가지는 것은 우 장춘 박사님이 1935년 십자화과 작물의 육종에 기초를 세운 U 삼각 모델을 계승할 만한 십자화과 작물에 대한 연구가 국내 학자들에 의해서 이뤄지지 못하고 있다는 실정이다. 농촌진흥청 뒷산에 우 장춘 박사님의 묘소에 매년 일본에서 참배객들이 온다는 사실을 생각하면 우리는 우 장춘 박사님의 업적에 대해서 너무나 많이 모르고 있다는 생각이 든다. 따라서 국내에서도 십자화과 채소에 대한 연구를 많이 해서 우 장춘 박사님이 세운 그 업적을 더욱 빛낼 수 있도록 많은 지원을 해서 이 분야를 세계적인 수준으로 높이는 것 또한 국민 정서에 좋은 영향을 미칠 수 있기에 본 연구 수행의 필요성은 절실하다고 할 수 있다..

나. 국내 외 관련기술의 현황과 문제점

국내는 80년대에 원형질체 배양에 관한 연구가 성행하다가 지금은 몇몇 연구자들만이 하고 있는 실정이다. 게다가 원형질체 융합에 관한 연구는 모두 대칭 융합이며, 잡종 식물체의 경우, 담배와 페츰니아 융합에 의한 체세포 잡종 식물체가 강원 대학교 생물학과 김 준철 교수 팀에 의해서 얻어졌지만 농업적으로 이러한 잡종 식물체가 이용될 가능성은 없다. 몇 년 전 까지만 해도 유전 공학 연구소의 유 장렬 박사 팀의 이 행순, 김 석원 연구원에 의해서 인삼과 당근의 원형질체의 대칭 융합에 의한 잡종 식물체 생산이라는 연구 과제가 수행되었다. 최근에 국내서 원형질체배양 및 융합을 시도하고 있는 과학자는 농촌진흥청 농업과학기술원의 김 호일 박사 팀의 이 연희 연

구사이다. 이 연희 연구사는 십자화과 채소의 원형질체 융합을 주로 하고 있다.

충남 대학교 생물학과 방 재욱 교수님 팀에서도 시효와 당근과의 세포 융합을 시도할 예정이라고 한다. 또한 본인과 공동 연구를 수행하고 있는 농촌진흥청 고랭지 농업 시험장 원예과의 김 원배 연구관 팀에서 카아네이션과 실패랭이와의 원형질체융합에 의한 신품종 개발에 관한 연구를 2년차 수행하고 있다. 이상에서 언급한 것처럼 국내에서는 아직까지 이 분야가 초기 단계에 놓여 있는 실정이다. 외국의 경우 본인이 1994-1995에 걸쳐서 연구원으로 있던 스웨덴의 옴살라 대학교의 Glimelius 교수 팀은 십자화과 작물간에 세포 융합을 통해서 세포질 응성불임 개체 와 지방산 함량이 높은 식물체를 육종하는데 성공하였다. 특히 지난해 이탈리아에서 열린 국제 식물 조직배양 학회에서는 *B. napus* 와 *Lesquerella fendleri* 사이에 잡종 식물체에서 높은 fatty acid 함량이 높은 식물체를 생산할 수 있었다. 미국 코넬대학교의 Elizabeth D. Earle 교수는 국제 식물 조직배양 학회에서 "Male-sterile Brassica oleracea cybrid vegetable production via protoplast fusion" 이라는 주제로 한 특강에서 본인은 원형질체 융합 기술이 실제 작물의 분자 육종 기술에 이용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 1996년 11월 코넬대학교 Earle 교수님 팀을 방문해서 조언을 얻고, 실험에 대해서 많은 토론을 했다.

1995년7월에 본 연구자는 처음으로 유체의 응성불임성을 만드는데 성공한 프랑스 베르사이유에 위치한 INRA 연구소를 방문해서 펠레디에 박사를 만났다. 논문에서만 만들었는 것이 아니라 실지로 유체의 육종에 안정적으로 이용되고 있다. 이미 유체의 경우 특허를 냈다고 했다. 우리도 서둘러 이분야를 개발해서 배추같이 우리의 주 십자화과 채소에 특허를 내고자 한다.

본인은 스웨덴에서 " Somatic hybrids between ginseng and carrot" 이

라는 과제로 실험을 수행해서 비대칭 융합으로 잡종 식물체를 만들어서 현재 분석 중에 있다. 또한 십자화과작물의 세포 융합에 관한 한 세계적인 권위자인 Tage Eriksson 과 K. Glimelius 의 실험실에서 많이 배웠기 때문에 경쟁력 있는 연구를 할 수 있을 것이다.

전년도 연구결과로부터 볼 때 국내외 유전자 은행을 통하여 이미 200여종의 유전자를 확보하고 있으며 유전자들의 재분화 체계가 확립된 상태이며 실험들은 주요하게 세포질용성불임계통생산을 중심으로 체세포 잡종실험을 진행한 결과 이미 다섯가지 조합의 재분화 식물체를 획득하였으며 대부분 조합들의 분자생물학적 및 세포학적인 검증을 끝낸 상태이며 일부는 포장실험에 이용되고 있으며 기내에 유지되고 있는 식물체 전부가 곧 포장실험에 나가게 될것이다.

원형질체 융합 같은 분야는 오랜 기간의 연구를 통해서 만이 좋은 성과를 얻을 수 있다. 다른 분야보다도 실험실 know-how 가 많이 필요하고 결과를 얻기가 쉽지 않은 분야라는 이유 때문에 이 분야에 쉽게 뛰어 들기란 어렵다. 외국에서는 벌써 어느 정도 연구를 진척시켰고 본인이 일년간 이 분야에 세계적인 실험실에서 배웠기 때문에 기술상의 취약성은 완전히 극복할 수 있다. 또한 비대칭 융합을 하기 위해서는 X-ray 조사를 해야 하는데 국내에서는 대전에 위치한 원자력 연구소를 통해서만이 가능하다. 원자력 연구소의 이 영일 박사 팀에서 이 분야에 협조를 해 주실 것을 약속하였기 때문에 이러한 문제 또한 쉽게 해결될 것이다.

단지 아직까지 이 분야에 대한 인식이 형질 전환에 의한 품종개량 기술만큼 인정을 받지 못하고 있기 때문에 국가기관에서 장기적인 투자를 하지 못하고 있다. 십자화과 채소의 중요성을 볼 때 더 많은 과학자가 이 분야에 전념해야 함에도 불구하고 국내에서는 앞에서 언급했듯이 농업과학기술원의 김 호일 박사 팀에서만 수행하고 있는 실정이다. 지금까지 농업 유전 공학에

의해서 유용한 형질을 도입해서 신품종을 육성하는 연구를 수행하는데 있어서 대부분의 학자들은 F1 hybrid 를 이용하고 있기 때문에 실제로 육종에 이용되는 경우가 거의 불가능하거나 고정시키는데 많은 세대를 요한다. 그리고 이유는 유전 공학에 관여하는 과학자들이 field 감각이 부족하고, 종묘 회사 같이 직접 품종 육성에 관여하는 연구 기관과 공동으로 연구하는 풍토가 국내에서는 아직까지 부족한 실정이다.

외국의 경우는 종묘 회사에서 대학교 교수들에게 많은 연구비를 투자해서 많은 품종을 만든 것을 고려해 볼 때 우리도 조금은 늦은 감이 있지만 이 분야만큼은 충분히 따라 잡을 수 있다고 생각한다. 현 시점에서는 기술상의 문제는 전혀 없다고 생각되어 진다.

다. 앞으로의 전망

외국에서는 종묘 회사에서 이 분야에 많은 연구비를 투자하고 있으며 코넬대학교의 Earle 교수 팀에서 만든 세포질 융성불임성 식물체가 포장 시험에 들어가고 있을 정도로 그 발전 과정은 빨리 진행되고 있다. 다행히도 우리가 가장 많이 재배하고 있는 배추 같은 십자화과 채소에는 손을 대고 있지 않지만 한국을 비롯한 동남아 시장을 노리고 있는 외국 종묘 회사 입장에서 곧 연구에 착수할 것으로 생각된다. 이러한 점을 인식한 국내 종묘 회사에서는 최근 들어서 이 분야에 상당한 관심을 보이고 있다.

따라서 십자화과 채소, 특히 배추 종자의 국내 판매의 대부분을 차지하고 배추 육종 분야에 세계 최고의 수준을 갖춘 중앙 종묘 육종 연구소 십자화과 채소 팀과 공동 연구를 할게 된다면, 세계 경쟁을 이길 수 있는 좋은 품종을 육성하기 위한 기초를 본 과제를 통해서 이뤄질 것으로 본다. 본 연구를 통해서 얻어진 우수한 품종은 국내뿐만 아니라 외국으로 수출이 되어서

외화를 벌어들일 것이다.

라. 국내에서 연구 개발하는 대신 기술 도입을 한다면 가능한가 ?.

종묘 회사에서 가장 많은 관심을 가지고 있는 분야는 채종을 손쉽게 해 줄 옹성불임성 계통을 만드는 것이다. 벨지움과 미국에서 옹성불임성 식물체를 유전 공학 기법에 의해서 만드는 것에 성공을 했다. 이러한 회사에서 영업 사원이 국내 종묘 회사를 순회하면서 영업을 하고 있다. 어느 종묘 회사에 의하면 기술 이전의 조건으로 공동 연구를 하는데 막대한 돈을 지불하고, 품종으로 만든 다음에도 로얄티로 막대한 돈을 지불해야 하기 때문에 엄두를 못 내고 있다고 했다. 이러한 일이 많이 일어나기 전에 빨리 우리 자체적으로 기술을 개발하는 것이 필요하다. 특히 원형질체 융합의 경우는 기술상의 문제에 특허가 걸려 있지 않기 때문에 기술개발 및 응용에 별 문제가 없다. 앞에서 언급했듯이 이 분야의 기술은 본인이 스웨덴에서 익혔기 때문에 우리 실정에 맞는 십자화과 채소 종류 및 품종으로 기술을 잘 접목시킨다면 외국에서 하지 못한 일을 우리가 할 수 있을 것으로 생각한다. 따라서 본인은 막대한 돈을 들이면서 기술 이전할 필요성이 없다고 생각한다.

2. 연구 개발 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종 목표

(1). 자가불화합성이 약하여 채종이 어려운 양배추, 브리컬리, 컬리플라워의 옹성불임성 계통을 만들어 채종의 효율성을 100% 이상 올린다. 이것이 성취되면 짙 가격으로 우수한 F1 종자를 대량으로 생산이 가능하기

때문에 F1 종자의 대부분을 수입에 의존하는 동남아 국가들은 물론 가까운 일본을 비롯한 선진국으로도 수출이 가능할 것이다. 아시아/태평양지역에서 1994 년에 수입된 종자로 재배한 면적은 총 10,042,928 ha 인데, 이 중에서 십자화과 채소인 양배추 (619,261), 배추 (774,817), Pakchoi (489,000), 콜리플라워 (327,705), 무(739,657) 가 상당한 양을 차지하고 있다 (FAO, 1994). 국내 종자시장은 200-300억에 불과하기 때문에 우리도 일본같이 외국의 종자시장을 겨냥한 육종을 하지 않을 수 없다.

(2). 우리나라의 주 수출작물인 배추는 자가불합성이 다른 십자화과 채소에 비해서 다소 강하지만 교잡율의 저하로 체중상의 어려움이 많이 있다. 따라서 융성불임성 배추를 육성함으로써 체중의 효율성이 높이게 되면 이형주의 비율을 현격하게 줄일 수 있기때문에 경제적으로 많은 이익을 가져올 것이다. 또한 100% 의 교잡율로 종묘분쟁의 소지가 거의 없을 것이다. 지금까지 매년 백만불이상씩 수출을 해온 배추의 수출량을 급속히 증가시켜 국가 경제에 보탬이 되고자 한다.

(3). 내병성을 지닌 품종을 육성한다. Clubroot 는 유럽의 경우 심각한 피해를 주고 있으며, 국내에서도 점차적으로 번지고 있다고 한다. 현재 바이러스 피해로 배추생산에 많은 피해를 주고 있지만, clubroot 가 번질 경우 더욱더 심각한 피해를 줄 것이다. 이에 대비해서라도 저항성 품종을 육성해야 된다. 외국의 경우 원형질체 융합기술을 이용해서 신품종 개발에 착수하고 있다. 또한 포마링감이나 푸사리움에 대한 저항성 품종을 육성하고자 한다.

(4). 체중의 효율을 높이기 위한 개화기연장 또는 무추대성 식물체를 생산한다. 이미 chinese cabbage 와 cabbage 사이의 세포융합에 의해서 얻어진 식물체중 개화기가 연장되거나 추대가 전혀 되지 않은 개체를 얻었다는 보고가 있다. 개화기가 서로 달라서 교배하는데 문제가 많기 때

문에 이러한 계통들이 육성된다면 교배율을 높일 수 있는 획기적인 일이 될 것이다.

제 2 장 십자화과 유전자원 수집 및 특성검정

제1절 서 설

십자화과 품질 향상을 위하여 고전적인 육종방법과 더불어 현대 생물공학 적 방법들이 활발하게 진행되고 있다. 즉 세포융합방법이나 외래 유용유전자의 도입 방법들이 이루어지고 있다. 특히 세포융합방법은 세포질 내에 있는 엽록체나 미토콘드리아에 있는 특성을 타 식물체로 전이하는데 많이 사용되고 있다. 또한 외래유전자를 직접 원형질체에 도입하는 실험들도 성공한 사례들이 있다. 이러한 세포융합이나 형질전환방법에 있어서 필수적이고 기본적으로 필요한 요인들은 다음과 같다.

첫째, 실험이 필요한 식물체 재료들이 확보되어야한다.

둘째, 식물재료들이 재분화가 재현성 있게 일어나야 한다.

셋째, 이러한 실험재료들이 가지고 있는 특성들이 검정되어야한다.

제2절 유전자원수집

미국의 Iowa state university 와 Cornell university 의 gene bank 그리고 university of Wisconsin-Madison department of plant pathology 의 crucifer genetics cooperative(CrGC)에서 각종 유전자원 및 옹성불임계통을 비롯한 200여가지 품종을 수집하였다. CrGC에서 수집된 계통들은 대부분이 Rapid cycling인데 Rapid cycling *Brassica* stock들은 최근에 개발된 것들로써 생활환이 짧아서 1년에 여러 세대를 증식할 수 있기 때문에 유전연구 중

은 연구재료로 이용될 수 있다.

Rapid cycling stock들에는 세포질 융성불임성, 제초제 저항성, 병저항성과 같은 여러 가지 우수한 형질들을 가지고 있다. 그러나 재래육종방법으로 이러한 형질도입은 한계성이 있다. 다행스럽게도 세포융합이라는 방법으로 전통적인 육종방법으로 불가능한 형질들을 도입이 가능하여 졌다.

국내 유전자 자원의 수집은 주요하게 참여기업인 중앙종묘(주) 오산육종연구소 십자화와 채소팀에서 직접 교배 육성한 inbred line 들로 이루어졌다.

중앙종묘에서 교배 육성된 inbred line 들은 체세포잡종식물 개발을 위하여 육성 유지 증식하였으며, 그 중에서 재분화율이 비교적 높은 계통을 선발하여 체세포잡종식물체 개발의 효율을 증진시키려고 하였다.

1. 계통 및 기본재료의 육성

약배양 효율이 높은 계통을 포함한 75계통을 파종하여 기본재료 육성 및 증식을 위한 교배육성을 수행하였다.

2. 재분화율이 높은 재료육성

식물체 재분화율이 높은 재료육성을 위하여 재분화율이 높은 순무와 배추의 교잡을 시도하고자 교배작업을 수행하였다

3. MS 재료육성

MS 재료의 분석 및 증식을 위하여 교배육성을 수행하였으며 MS의 안정성이 확인되면 다양한 배추속 작물과의 교잡을 통하여 재료를 육성하였다.

여러 가지 경로를 통하여 수집한 유전자원들은 아래 표에서 상세하게 기록하였다.

표11. Gene bank에서 수집한 유전자원의 종류 및 분류

GNU	Accession	Source	Taxonomy	Origin
1	PI 115881 86GI	Conell	<i>B. oleracea var botryais</i>	India
2	PI 141572 76PI		<i>B. oleracea var capitata</i>	Iran
3	PI 163488 760I		<i>B. oleracea var capitata</i>	India
4	Pi 164954 66GI		<i>B. oleracea var capitata</i>	Turkey
5	PI 169034 78GI		<i>B. oleracea var botryais</i>	Turkey

그 외 60품종

I133	PI193459	Iowa	<i>B. carinata</i>	Ethopia
I134	PI209023		<i>B. carinata</i>	Puerto rice
I135	PI261200		<i>B. carinata</i>	Poland
I148	PI120923		<i>B. juncea</i>	Turkey
I150	PI169076		<i>B. juncea</i>	Pakistan
I151	PI173857		<i>B. juncea</i>	India
I152	PI184290		<i>B. juncea</i>	England

그 외 100품종

표 12. CrGC(Crucifer Genetic Cooperative)에서 수집한 유전자원의
종류 및 분류

No	Accession	source	Taxonomy	Character
CrGC1-30	1-30	CrGC	<i>B. rapa</i>	Ogura CMS
CrGC4-3	4-3		<i>B. juncea</i>	Anand CMS
CrGC5-9	5-9		<i>B. rapa</i>	Anand CMS
CrGC3-7	3-7		<i>B. oleracea</i>	Ogura CMS
CrGC3-8	3-8		<i>B. oleracea</i>	Ogura CMS

그외 28종

표13. 중앙종묘(주)오산육종연구소에서 분양받은 계통의 종류 및 분류

No	Common name	source	Taxonomy
KW1	chinese cabbage	중앙종묘(주)	<i>B. campestris ssp perkinesis</i>
KW2	chinese cabbage		<i>B. campestris ssp perkinesis</i>
KW9	chinese cabbage		<i>B. campestris ssp perkinesis</i>
KW23	chinese cabbage		<i>B. campestris ssp perkinesis</i>
KW24	chinese cabbage		<i>B. campestris ssp perkinesis</i>
KW66	chinese cabbage		<i>B. campestris ssp perkinesis</i>
KW67	chinese cabbage		<i>B. campestris ssp perkinesis</i>
KW11	broccoli		<i>B. oleracea var italica</i>
KW12	broccoli		<i>B. oleracea var italica</i>
KW13	broccoli		<i>B. oleracea var italica</i>
KW27	broccoli		<i>B. oleracea var italica</i>
KW104	broccoli		<i>B. oleracea var italica</i>
KW105	broccoli		<i>B. oleracea var italica</i>
KW68	mustard		<i>B. juncea</i>
KW69	mustard		<i>B. juncea</i>
KW16	kale		<i>B. oleracea var acephala</i>
KW28	cabbage		<i>B. oleracea var capitata</i>

그외 18종

제3절 CMS primer 합성 및 응성불임 개체의 확인

세포질 응성불임성 특성을 지닌 체세포잡종식물체를 생산하기 위하여 *B. campestris*, *B. rapa*, *B. oleracea*의 응성불임계통과 임성계통의 식물체를 선발하였다. (표14)

표14. 세포질응성불임특성 검정을 위한 PCR실험에 이용된 *Brassica* 계통들

Taxa	Accession
<i>B. campestris</i> <i>B. rapa</i>	kw2, kw9, kw23, kw24, CrGC1-30, CrGC1-31, CrGC1-32
<i>B. oleracea</i>	CrGC3-1, CrGC3-7

선발된 식물체들의 DNA는 CTBA방법으로 추출하였다. CMS의 특성을 검증하기 위한 특정 Primer는 여러 문헌들에 기초하여 무의 mtDNA에 있는 trnfM, ORF105, atp6, orf138, orfB region 과 벼의 mtDNA의 atp6 coding region 으로부터 합성하였는데 그 sequence는 표15에서 보는 바와 같다. PCR 반응은 Primer가 10mer 이상이 된다는 점에 감안하여 promega Taq polimerase와 충일 화학의 Dynazyme을 사용하였다.

PCR 조건은 200ng의 DNA에 2.5mM dNTP, 10Xbuffer, 1.25U Taq polymerase, 20pmol의 primer를 첨가하여 반응물을 50 μ l로 하였다. 반응물은 먼저 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 변성시킨 다음 94 $^{\circ}$ C에서 30s, 51 $^{\circ}$ C에서 1min, 72 $^{\circ}$ C에서 2min 씩 30cycle을 증폭시킨후 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 유지시켰다. 증폭된 PCR 산물

은 1% agarose gel에 전기 영동하여 EtBR 로 염색하여 UV에서 밴드의 양상을 관찰하여 667 polarloid 필름으로 인화하였다.

표 15. 세포질웅성불임특성 검정에 사용된 primer 조합

Number of primer	Sequence
KNU-1-A	5'-AGAGGAATTGGTCAACTCATCA-3'
KNU-1-B	5'-GAACTGCGAGTCAATCCACG-3'
KNU-1-C	5'-TAAAGAGTAAGTGTTTAGGTA-3'
KNU-2-A	5'-ATGGGTTTGAATCAGAGAGA-3'
KNU-2-B	5'-ATTCAATTATGAAATTACTC-3'
KNU-2-C	5'-ATGGCAAATCTGGTCCGATG-3'
KNU-2-D	5'-ACTTACTTAGGAAAGACTAC-3'
KNU-3-A	5'-GTCGTTATCGACCTCGCAAGG-3'
KNU-3-B	5'-GTCAAAGCAATTGGGTTCAC-3'

여러 가지 특정 Primer을 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과 벼의 웅성불임계통관련 primer와 무의 mitochondria apt6gene에서 형성한 밴드는 다형성 밴드를 형성하여 각 계통간에 특징적인 밴드를 나타내고 있으나 세포질웅성 불임성 개체로 추정하기에는 부적합하다는 것을 알 수 있었다. 이에 반해 무의 mitochondria OrfB locus에서 제작된 primer는 Ogura 세포질 웅성불임개체에서만 특정밴드를 형성하였다. 이로부터 십자화과에서 Ogura 세포질 웅성불임성형질을 나타내는 marker로 이용 가능함을 확인 할 수 있었다.

특정 Primer들을 이용하여 확인한 Ogura CMS의 밴드양상을 500bp에서 단일 밴드임을 확인 할 수 있었다.(그림 1)

M 1 2 3 4 5



그림1 무 Ogura 세포질 융성불임특정 primer를 이용한 세포질
융성불임특성 확인 1-4 500bp에서 보는 CMS 밴드이며 5는
세포질융성불임특성을 가지지 않는 개체

제 3 장 계통육성 및 채종체계 확립

제 1 절 서 설

배추과 채소의 체세포 잡종 기술을 개발하고 체세포 잡종에 의한 신품종 육성을 위하여 다양한 유용 형질을 가진 유전 자원을 수집하고 수집된 유전 자원으로부터 유용 유전 자원을 검정 선발하고 순화하여 잡종 식물체를 형성하기 위한 소재를 확보하여야 한다.

이를 위하여 본 과제를 통하여 보다 다양한 배추과 채소 유전 자원을 수집하여 유용 유전자를 탐색하고 순화 과정을 거쳐 체세포 잡종 개발에 이용토록 하고자 계통 육성을 수행하였으며, 얻어진 잡종 식물체의 임성을 검정하고 채종 체계를 확립하여 실용 품종 개발에 이용하고자 하였다.

그 동안 국내의 배추과 채소에 관련된 연구는 배추와 무가 주를 이루고 있으며 일부 양배추와 브로컬리 등에 대한 연구가 수행되었다. 또한 유채에 대한 연구가 일부 수행되었으나 이는 종실을 목적으로 하는 경우와 사료용으로 사용하기 위한 연구로 채소로서의 연구는 이루어지지 않고 있다.

본 연구팀에서는 본 과제 시작 전부터 중앙종묘(주)에서 개발하여 실용화 단계에 있는 재료와 새로이 수집한 재료들을 이용하여 체세포 잡종 식물체 개발에 이용하고자 하였다.

제 2 절 연구내용

1. 계통육성을 위한 유전자원의 수집

표 16. 수집된 유전자원

(단위 : 점)

구 분	1년차	2년차	3년차	4년차	계
배추	150	132	32	26	340
유채	8	7	-	-	15
갓	12	28	15	4	59
양배추	76	36	42	24	178
기타	9	14	11	7	41
계	255	217	100	61	633

유전자원의 수집은 강원대에서 국내외 gene bank로부터 다양한 유전자원을 수집하였다. 중앙종묘에서는 해외 판매망을 통하여 해외의 유전자원을 수집하였으며 일부 중앙종묘에서 수집하여 보존중인 재료를 이용하였다. 본 과제를 통하여 수집 검정한 유전자원은 배추 340점, 유채 15점, 갓 59점, 양배추 178점, 기타 배추과 41점으로 총 633점이었으며, 이들중 후대를 유지한 자원은 배추 281점, 유채 13점, 갓 53점, 양배추 118점, 기타 22점으로 총 487점이었다.

2. 유전자원 검정

수집된 유전자원은 반드시 그 특성들이 검정되어야 하며 특성의 안정성도 검증되어야 만이 실험재료로 이용될 수 있다. 아울러 본 팀에서는 수집된 유전자원들에 대하여 발아테스트, 후대유지점수와 같은 실험들을 수행하였다(표17).

표 17. 유전자원의 검정(단위 : 점)

구 분	배추	유채	갓	양배추	기타	계
총점수	340	15	59	178	41	633
발아점수	286	13	54	124	27	504
후대유지점수	281	13	53	118	22	487

3. 수집 유전자원 특성검정 및 계통육성

수집유전자원 가운데 배추와 갓 그리고 양배추를 주 대상으로 특성검정과 계통육성을 수행하였다(표 18,19,20).

가. 배추 유전자원의 자가불화합성 검정

배추의 자가불화합성 검정은 당일 개화한 25개의 꽃에 신선한 꽃가루를 수분한 후 등숙기에 해당 종자수를 조사하여 판정하였다. 해당 종자수 2립

이하를 자기불화합성이 강한 것으로, 2-5립을 중간으로, 5립 이상을 약한 것으로 판정하였다.

배추유전자원의 자기불화합성 검정에서 80점이 자기불화합성이 강한 것으로, 77점이 자기불화합성이 약한 것으로 조사되었다. 이들 중 도입 당시 세대의 자기불화합성에 개체 변이가 존재하던 것이 세대 진전을 통하여 자기불화합성이 안정된 계통은 후 세대의 자기불화합성 조사 성적에 따라 강약을 표시하였다. 도입 당시 세대의 자기불화합성에 개체 변이가 존재하는 경우 계통육성 과정에서 자기불화합성의 강약을 선발의 기준으로 사용하지는 않았다. 이는 옹성불임성을 이용한 일대잡종 생산에 이용할 경우 계통의 자기불화합성의 강약은 육성자의 관점이나 이용형태에 따라 각기 장단점 어느 쪽으로도 작용할 수 있기 때문이다.

나. 배추와 갓의 TuMV 저항성 검정

배추와 갓의 TuMV 저항성 검정은 중앙종묘에서 분리하여 사용중인 TuMV 계통을 순무에 접종하여 증식한후 병징이 전신감염으로 나타난 이병잎을 채취하여 이들 감염잎에서 추출한 즙액을 바이러스 접종원으로 이용하였다. 접종은 carborundum을 이용하여 9공 연결포트에 파종하여 본엽이 6-7매 전개된 배추와 4-5매 전개된 갓에 접종하였으며 접종전 2일 동안 50% 차광망으로 차광을 실시하였다. 접종 후 7일과 12일에 조사를 실시하였다.

TuMV 저항성 검정에서 배추는 37점이 내병성이 강한 것으로 조사되었으나, 갓에서는 저항성이 강한 것이 조사되지 않았다. 이들 중에는 도입 당시 TuMV 내병성이 개체 차이를 보였으나 계통 선발 과정에서 강하게 고정된 계통이 포함되어있다. 개체 변이를 보이는 경우는 내병성이 강한 개체를 선발하여 다음 세대로 진전 시켰으며, 형태 변이가 심한 경우에 한하여 TuMV 저

항성 이외에 형태적 특성을 고려하여 선발을 수행하였다. 특히 내병성이 강한 것으로 조사된 37점 중에는 중국으로부터 도입된 재료들이 많았다.

다. 배추, 갓, 양배추의 무사마귀병 저항성 검정

배추, 갓, 양배추의 무사마귀병 저항성 검정은 중앙종묘에서 분리하여 사용중인 무사마귀병균 계통을 이용하여 병토삽입법으로 접종하여 조사하였다.

peat : perlite : vermiculite : 멸균토양을 1 : 1 : 2 : 1로 혼합한 배토에 병균농도를 5×10^6 /g(건토)으로 조절한 현탁액을 혼합하여 하여 병토를 만들어 24시간 실온에 방치 한 후 멸균상태를 넣은 9공 연결포트에 직경 3cm 정도의 시험관으로 4-5cm의 깊이로 눌러 구덩이를 만들고 조제한 병토를 구덩이 속에 삽입하고 병토의 중앙에 2-3립의 종자를 파종하였다.

파종한 종자는 vermiculite로 복토하였으며 발아하여 자엽이 전개되었을 때 1주만 남기고 나머지 묘는 제거하였다. 접종상의 재배관리는 토양수분이 포화상태가 유지되도록 저면 관수를 하여 4주간 유지하였으며 파종 후 40일에 조사하였다.

무사마귀병 저항성 검정을 통하여 내병성이 강한 것으로 조사된 재료는 배추 29점이었다. 갓과 양배추에서는 내병성이 강한 것으로 조사된 재료가 없었다. 내병성이 강한 것으로 조사된 29점 가운데 내병성 인자가 고정된 것으로 판단되는 재료는 부표에 저항성이 8로 표기된 10점이었다.

이들 중에는 계통육성 과정을 통하여 후대에서 인자가 고정된 것으로 판단되는 계통이 많았으며 이들의 경우 후 세대의 성적에 의하여 표기하였다. 이들 내병성이 강한 것으로 조사된 29점 중에는 일본으로부터 도입된 재료들이 많았으며, TuMV에서와는 달리 중국으로부터 도입된 재료들 가운데에는 무

사마귀병에 강한 재료가 발견되지 않았다.

라. 양배추의 흑부병 저항성 검정

양배추의 흑부병 저항성 검정은 중앙종묘에서 분리하여 사용중인 흑부병균 계통을 이용하였다. 양배추는 직경 9cm의 흑색 비닐 포트에 재배하여 본엽이 6-7매 전개되었을 때 10^6 cfu/ml 농도의 병균을 분무한 후 비닐터널을 설치하고 70% 차광망을 덮고 5일간 높은 습도를 유지하였다. 접종상의 온도는 25-27℃ 정도를 유지하였다. 접종 후 7일과 15일에 조사하였다.

흑부병 저항성 검정을 통하여 내병성이 강한 것으로 조사된 재료는 16점이었다. 이들 16점 중에는 동남아시아와 인도 등지로부터 도입된 재료들이 많았다.

마. 양배추의 줄나방 저항성 검정

양배추의 줄나방 저항성 검정은 중앙종묘에서 사육한 줄나방을 사용하였다. 줄나방은 배추를 먹이로 사육하여 방사하였다. 양배추를 직경 15cm의 흑색 비닐포트에 재배하여 본엽이 8-10매 전개된 후 방충망을 설치한 플라스틱 하우스 내에 우화직전의 번데기를 $50/m^2$ 마리씩 방사하였다. 방사 후 15일과 25일에 섭식흔의 수와 크기를 조사하여 판정하였다.

줄나방 저항성 검정을 통하여 저항성이 강한 것으로 조사된 재료는 7점이었다. 이들 재료는 동남아시아와 인도 그리고 유럽으로부터 도입된 재료들이었다.

사. 약배양을 통한 계통육성

약배양에 의한 식물체 재분화율이 높은 계통 선발은 수정-B5 배지에서 배상체 발생율이 높은 계통을 선발하였다. 수정-B5 배지의 조성은 sucrose 농도를 10 및 15%로 하였고, 2,4-D와 NAA를 각 0.01mg/L 첨가하였다.

약배양을 통하여 획득한 식물체의 절반 가량이 정상적인 화분을 생성하고 임성을 갖는 것으로 조사되었으며, 이들 약배양 유래 식물체중 정상 임성을 갖는 개체들을 인공 교배에 의하여 후대를 유지하고 후대 A1 세대에서 증식을 수행하여 잡종식물체 창출을 위한 재료로 활용토록 하였다. 약배양을 통하여 식물체 분화율이 높은 계통을 선발하고자 수행한 결과 모용이 없는 “권심계” 재료들의 약배양에 의한 식물체 분화율이 현저하게 높았으며, 식물체 분화율이 높은 순무를 친으로 하여 작성한 F₁식물체의 약배양 식물체 획득율이 높았다.

표 17. 배추 유전자원 특성표

NO	자가불 화합성 강약	모용 유무	TuMV 저항성	Club root 저항성	외엽수	결구 엽수	추대성	종특색
1	중	유	2	3	11	52	중	백
2	약	유	3	2	13	43	중	백
3	약	유	2	1	14	46	중	녹
4	중	무	4	1	14	32	중	백
5	강	유	1	2	13	59	중	백
6	중	유	2	1	15	66	중만	녹
7	중	유	5	3	16	56	중	녹
8	약	유	5	3	11	54	중조	백
9	중	유	3	2	12	55	중	백
10	중	무	2	1	13	27	중만	백
11	강	무	2	3	10	32	중조	녹
12	중	유	3	2	8	49	중	백
13	강	무	4	1	13	21	중	백
14	중	유	5	2	13	57	중	녹
15	약	유	4	3	12	45	만	백
16	중	유	3	3	11	43	중	백
17	중	유	2	3	14	55	중	백
18	약	유	5	2	15	56	중	녹
19	강	무	3	7	8	33	조	백
20	중	무	3	3	9	28	중조	백

* 자가불화합성(개화 수분시 헵당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자기불 화합성 강약	모용 유무	TuMV 저항성	Club root 저항성	외엽수	결구 엽수	추대성	중특색
21	약	유	4	2	15	63	중만	녹
22	약	유	7	3	19	54	중	녹
23	중	유	5	3	14	49	중	백
24	중	무	5	2	7	30	조	백
25	중	무	2	2	9	28	조	백
26	강	무	3	1	11	41	중조	백
27	강	유	4	2	15	46	중	녹
28	중	유	3	2	16	44	중	백
29	약	유	5	3	13	52	중	백
30	중	무	4	3	11	38	중조	백
31	중	유	3	2	16	44	중	녹
32	강	유	3	3	14	46	중	백

* 자기불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구 엽수	추대성	증류 색
	합성강약	유무	저항성	저항성				
33	약	유	3	2	15	42	중	백
34	약	유	3	3	16	52	중	백
35	중	무	2	1	14	44	중조	백
36	중	무	2	1	12	30	조	백
37	중	유	1	2	14	52	중만	백
38	중	유	2	1	14	61	중	녹
39	강	유	5	3	18	54	중만	녹
40	약	무	6	3	10	57	중만	백
41	약	유	3	2	13	53	중	녹
42	중	무	6	4	9	28	중	백
43	약	무	2	3	11	34	중조	백
44	중	유	4	2	17	45	중	백
45	강	무	4	1	10	23	조	백
46	강	무	5	2	10	54	중만	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불 화합성 강약	모용 유무	TuMV 저항성	Club root 저항성	외엽수	결구 엽수	추대성	증류색
47	약	유	3	3	14	44	만	백
48	강	유	3	3	13	52	중	백
49	중	유	2	2	14	48	중	백
50	강	유	5	2	12	49	중	백
51	강	무	2	5	7	30	조	백
52	약	무	3	7	9	26	조	백
53	약	유	4	3	14	53	중만	녹
54	약	유	7	3	15	49	중	백
55	중	유	4	3	14	49	중	녹
56	약	유	5	2	11	39	중	백
57	중	무	2	2	9	27	조	백
58	강	무	3	4	11	37	중조	백
59	강	유	4	3	14	52	중	녹
60	약	유	3	2	15	48	중	녹
61	약	무	5	3	14	46	중	백
62	약	무	4	2	10	33	중	백
63	중	유	2	2	14	45	중	백
64	약	유	3	5	12	49	중	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구	추대성	증특색
	합성강약	유무	저항성	저항성		엽수		
65	강	유	7	2	9	41	중	녹
66	약	유	4	2	11	48	중만	백
67	약	유	3	1	12	47	중	백
68	강	유	3	4	11	43	중	백
69	중	무	2	3	11	34	중조	백
70	약	무	8	2	13	35	중조	백
71	강	유	7	2	12	53	중	백
72	중	무	3	2	9	24	조	녹
73	약	무	4	5	11	46	중조	백
74	중	유	7	3	19	48	중만	백
75	강	유	7	3	16	47	중조	녹
76	중	유	3	3	14	48	중만	녹
77	강	유	2	2	13	53	만	백
78	중	무	4	7	8	34	중	녹
79	약	무	8	6	12	31	조	백
80	중	유	8	3	15	54	중만	녹

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구	추대성	증특색
	합성강약	유무	저항성	저항성		엽수		
81	강	무	4	8	12	42	중	백
82	약	유	2	7	14	59	만	녹
83	강	유	4	3	8	45	중	백
84	중	유	2	7	10	46	중조	백
85	중	유	4	7	12	51	중만	백
86	강	유	6	8	14	53	중	백
87	약	유	7	3	13	55	중만	백
88	약	무	8	3	12	39	중	녹
89	약	무	2	2	11	29	조	백
90	중	유	4	4	12	47	중	녹
91	중	무	2	4	13	32	중	녹
92	강	유	3	1	14	48	중	녹
93	중	무	4	3	14	36	중조	백
94	약	무	2	5	11	31	중조	백
95	약	무	8	2	13	33	중	백
96	약	유	3	5	13	52	중만	녹

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화 합성강약	모용 유무	TuMV 저항성	Club root 저항성	외엽수	결구 엽수	추대성	중특색
97	강	유	7	2	13	47	중	백
98	강	유	8	2	14	58	중	녹
99	중	유	3	2	12	49	중	녹
100	중	유	4	2	16	43	중	백
101	강	유	3	2	14	57	중	녹
102	중	무	2	2	14	32	중조	백
103	약	무	2	3	11	33	중조	백
104	약	유	3	3	13	54	중만	녹
105	중	유	5	2	16	49	중	백
106	중	유	5	2	19	58	중	녹
107	중	유	7	2	14	44	중	백
108	강	유	8	2	15	42	중	백
109	약	무	2	2	12	27	조	백
110	강	유	4	2	15	55	만	녹
111	중	무	4	3	11	32	중조	백
112	강	유	4	3	13	48	중	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구 엽수	추대성	중특색
	합성강약	유무	저항성	저항성				
114	중	무	5	2	12	39	중	백
115	중	무	3	4	12	34	조	백
116	중	유	3	7	16	66	만	녹
117	강	유	3	2	13	56	중만	백
118	중	유	5	2	14	59	만	백
119	강	무	7	2	8	38	중	백
120	강	무	8	2	10	32	중조	백
121	중	무	2	2	11	31	중	백
122	중	유	3	5	14	57	중만	백
123	약	유	3	4	17	57	중	녹
124	약	유	5	2	13	53	중	백
125	중	유	4	2	12	56	중만	백
126	중	유	3	2	12	49	중	백
127	중	유	6	2	13	49	중	녹
128	강	무	4	2	10	35	중조	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구	추대성	중특색
	합성강약	유무	저항성	저항성		엽수		
129	약	무	3	3	10	48	중	백
130	중	유	2	2	12	52	중만	녹
131	중	유	2	2	12	52	중	백
132	약	유	5	2	13	53	중	백
133	중	무	3	2	11	32	중조	백
134	강	무	3	2	11	38	중조	백
135	약	유	3	2	14	44	중	녹
136	중	유	3	2	15	56	중만	백
137	강	유	4	3	14	52	중	녹
138	중	유	6	2	13	54	중	녹
139	약	무	4	2	10	35	중조	백
140	강	유	5	5	14	46	중	녹
141	중	유	7	2	13	43	조	백
142	중	유	2	2	16	48	중	녹
143	강	유	2	2	14	53	중만	백
144	중	무	3	2	9	33	중조	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구 엽수	추대성	증특색
	합성강약	유무	저항성	저항성				
145	약	무	4	2	8	37	중	백
146	약	유	2	6	12	48	중	녹
147	중	유	3	3	14	48	중	백
148	강	유	5	2	16	59	만	백
149	중	유	2	7	16	58	중만	백
150	중	무	7	7	12	29	조	백
151	강	무	4	2	8	27	조	백
152	약	유	4	3	15	43	중조	백
153	약	유	3	2	13	41	중	백
154	중	유	2	3	14	50	중만	녹
155	강	무	2	7	12	35	중조	백
156	강	유	3	2	14	49	중	백
157	약	유	7	2	14	61	중만	백
158	중	유	6	2	13	56	중만	녹
159	중	무	4	2	13	30	중조	백
160	중	무	3	2	11	31	중조	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구	추대성	증특색
	합성강약	유무	저항성	저항성		엽수		
161	중	유	2	3	16	43	중	백
162	중	유	7	3	14	42	중	백
163	중	무	3	2	11	35	중	백
164	중	유	2	3	14	48	중	녹
165	중	유	3	2	12	53	중만	백
166	중	유	3	5	15	47	중	녹
167	중	유	2	5	14	48	중만	백
168	강	무	8	7	10	35	중조	백
169	중	무	2	3	9	31	중조	백
170	약	유	4	8	17	48	중	백
171	강	유	3	8	15	57	중만	녹
172	중	유	6	5	14	53	중	백
173	중	무	2	3	12	34	중조	백
174	약	유	2	3	14	53	중만	백

* 자가불화합성(개화 수분시 헛당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구	추대성	중특색
	합성강약	유무	저항성	저항성		엽수		
175	강	무	4	2	12	32	조	백
176	강	무	7	2	7	28	조	백
177	강	유	7	8	10	46	중	녹
178	중	무	2	6	11	34	중조	백
179	약	유	4	3	13	52	중만	녹
180	중	유	8	8	16	58	중만	녹
181	강	유	6	8	17	62	만	백
182	중	유	2	3	15	57	중만	녹
183	약	유	3	3	19	46	중조	백
184	강	유	3	8	17	53	중	백
185	중	유	3	8	15	49	중	백
186	강	무	3	3	11	30	조	백
187	약	유	2	7	14	46	중조	녹
188	중	무	3	2	12	29	조	백
189	중	유	4	4	17	56	중만	녹
190	중	유	2	2	12	49	중	녹
191	강	유	6	6	16	53	중만	백
192	약	유	3	3	16	48	중	녹

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화 모용		TuMV	Club root	외엽수	결구 엽수	추대성	증류색
	합성강약	유무	저항성	저항성				
193	강	유	6	2	14	56	중만	백
194	약	유	3	2	17	54	중	녹
195	중	유	3	2	16	48	중	백
196	중	무	4	2	12	43	중	백
197	약	무	3	4	14	52	중만	백
198	중	유	4	2	14	54	중	녹
199	강	유	5	2	16	51	중	녹
200	중	유	4	5	14	48	중	백
201	강	무	3	2	13	46	중	녹
202	중	무	4	3	8	33	중조	백
203	중	유	3	2	14	55	중만	백
204	약	무	4	4	16	67	만	녹
205	중	유	7	7	15	53	중	백
206	강	유	6	2	17	48	중	백
207	강	유	4	3	14	55	중만	녹
208	중	유	5	3	18	49	중	백
209	중	유	4	5	15	50	중	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화 합성강약	모용 유무	TuMV 저항성	Club root 저항성	외엽수	결구 엽수	추대성	중특색
210	중	유	7	7	16	45	중	백
211	강	유	5	3	16	40	중	녹
213	약	무	5	3	12	36	중조	백
214	중	무	4	3	10	32	중조	백
215	중	유	7	5	16	58	중만	녹
216	중	유	8	2	18	53	중	녹
217	중	무	4	2	13	33	중조	백
218	약	무	2	3	11	32	조	백
219	중	무	5	4	11	29	조	백
220	강	유	6	6	18	59	중만	녹
221	약	유	4	8	15	62	만	녹
222	중	유	3	3	18	48	중	백
223	강	무	4	3	15	42	중	백
224	중	유	5	2	14	54	중만	백
225	강	유	6	6	12	46	중	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화 모용		TuMV	Club root	외엽수	결구 엽수	추대성	증류색
	합성강약	유무	저항성	저항성				
226	약	무	5	3	16	48	중	백
227	중	유	3	3	15	54	중만	녹
228	강	무	3	2	14	50	중만	녹
229	강	유	4	4	16	55	중	백
230	강	유	7	5	13	46	중	백
231	약	무	5	2	11	30	중조	백
232	강	유	4	3	17	47	중조	백
233	강	유	8	2	14	47	중	녹
234	중	유	4	2	16	55	중만	백
235	약	무	3	3	12	32	중조	백
236	강	무	3	2	10	26	조	백
237	중	유	6	2	15	57	중만	녹
238	약	유	5	3	18	44	중조	백
239	중	유	4	6	16	53	중만	녹
240	강	무	3	3	16	30	중조	백
241	강	유	5	3	14	50	중	녹

* 자가불화합성(개화 수분시. 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화합	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구 엽수	추대성	증류색
	성강약	유무	저항성	저항성				
242	중	무	3	3	12	29	조	백
243	약	무	4	2	12	32	중조	백
244	중	무	2	2	12	28	조	백
245	강	무	3	3	11	30	중조	백
246	강	유	5	2	19	49	중	백
247	약	유	4	7	17	55	중만	녹
248	강	유	6	2	16	56	중	백
249	중	유	5	7	10	48	중조	백
250	중	무	4	2	12	31	중조	백
251	강	유	7	5	12	48	중만	녹
252	약	유	6	4	17	52	중	백
253	약	무	3	2	11	34	중조	백
254	약	유	7	5	12	51	중만	녹
255	중	유	4	2	16	62	중만	녹
256	약	유	2	7	13	53	중만	녹
257	강	유	6	2	18	46	중조	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 17. 배추 유전자원 특성표(계속)

NO	자가불화	모용	TuMV	Club root	외엽수	결구 엽수	추대성	증류색
	합성강약	유무	저항성	저항성				
258	중	무	5	2	11	52	중	백
259	중	무	4	2	7	34	중조	백
260	강	유	2	3	14	56	중만	녹
261	중	유	3	3	15	56	중만	녹
262	약	유	3	2	17	43	중조	백
263	중	유	7	2	15	47	중	녹
264	강	유	7	3	14	58	중	백
265	약	무	3	2	11	32	중조	백
266	중	무	4	3	13	30	조	백
267	강	유	5	2	16	56	중만	녹
268	강	무	4	2	9	27	조	백
269	약	유	5	5	16	54	중	녹
270	강	무	3	2	12	32	중조	백
271	중	유	2	2	16	48	중	녹
272	약	유	2	7	15	55	중만	녹
273	중	유	7	2	14	52	중만	백
274	중	무	4	2	10	36	중만	백
275	강	유	2	5	15	54	중	백
276	중	무	4	3	12	30	중조	백
277	약	유	5	2	17	57	중	녹
278	중	유	7	3	15	49	중	백
279	중	유	5	3	18	54	중	백
280	강	유	4	2	14	48	중	녹
281	약	유	3	7	15	53	중	백

* 자가불화합성(개화 수분시 협당립수 기준): 2립이하 강, 2-5립 중, 5립이상 약

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 18. 갓 유전자원 특성표

NO	모용 유무	TuMV 저항성	Club root 저항성	엽수	엽색	결구습성
1	분리	2	2	11	녹	불결구
2	유	3	2	16	녹	불결구
3	무	2	1	8	녹자	불결구
4	무	2	1	13	녹	불결구
5	분리	1	2	14	자	불결구
6	분리	2	1	9	녹	불결구
7	유	2	2	11	자	불결구
8	유	2	2	13	녹	불결구
9	분리	2	2	12	녹	불결구
10	분리	2	1	24	녹	결구
11	분리	2	2	13	자	불결구
12	유	3	2	8	녹자	불결구

TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 18. 갓 유전자원의 특성표(계속)

NO	모용 유무	TuMV 저항성	Club root 저항성	엽수	엽색	결구습성
13	분리	1	1	9	자	불결구
14	분리	1	2	10	녹	불결구
15	분리	2	3	12	녹	불결구
16	유	1	3	11	녹	불결구
17	무	1	3	12	녹	불결구
18	분리	2	2	11	자	불결구
19	분리	2	2	8	자	불결구
20	분리	3	3	12	녹	불결구
21	분리	2	2	10	녹	불결구
22	유	1	3	9	녹	불결구
23	유	1	2	7	자	불결구
24	분리	2	2	9	녹	불결구
25	분리	2	2	9	녹자	불결구
26	분리	2	1	10	녹	불결구
27	유	2	2	13	녹	결구
28	유	3	2	13	녹	결구
29	유	2	3	16	녹	결구
30	분리	1	3	19	녹	결구
31	분리	3	2	23	녹	결구
32	분리	2	2	16	자	불결구
33	분리	2	2	22	녹	결구
34	유	1	2	26	녹	결구
35	유	2	2	25	녹	결구

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 18. 갯 유전자원 특성표(계속)

NO	모용 유무	TuMV 저항성	Club root 저항성	엽수	엽색	결구습성
36	분리	2	2	24	녹	결구
37	분리	3	2	27	녹	결구
38	유	2	1	14	자	불결구
39	분리	2	1	13	녹자	불결구
40	무	1	2	23	녹	결구
41	유	2	1	28	녹	결구
42	유	2	3	19	자	결구
43	분리	3	2	26	녹	결구
44	분리	3	2	17	녹자	결구
45	분리	2	1	13	자	불결구
46	분리	2	3	13	자	불결구
47	유	3	2	8	자	불결구
48	분리	2	1	19	녹	결구
49	유	2	2	23	녹	결구
50	유	2	2	18	녹자	결구
51	분리	3	3	21	녹	결구
52	분리	2	2	17	녹자	불결구
53	분리	2	2	15	녹	불결구

* TuMV 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

표 19. 양배추 유전자원 특성표

NO	초세	흑부병 저항성	Club root 저항성	좀나방 저항성	배축색	엽색	결구형
1	약	2	2	4	녹	녹	원구
2	약	2	2	4	자	녹	원구
3	중	2	2	2	녹	녹	원구
4	중	2	2	6	분리	녹	편구
5	강	5	1	4	분리	녹	원구
6	중	4	1	4	분리	녹	편구
7	강	7	2	4	녹	녹	원구
8	중	4	3	4	녹	녹	편구
9	약	2	3	4	분리	녹	편구
10	중	2	2	8	분리	녹	원구
11	강	2	4	4	자	자	원구
12	강	7	4	4	자	녹	원구
13	중	5	3	2	녹	녹	원구
14	중	6	2	4	분리	녹	편구
15	중	4	3	4	분리	녹	원구
16	강	3	2	4	분리	녹	편구
17	중	3	3	6	분리	녹	편구

흑부병 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

* 좀나방 저항성: 1(약)-9(강)

표 19. 양배추 유전자원 특성표(계속)

NO	초세	흑부병	Club root	좁나방	배축색	엽색	결구형
		저항성	저항성	저항성			
17	중	3	3	6	분리	녹	편구
18	약	6	2	4	분리	녹	편구
19	강	3	2	4	녹	녹	원구
20	중	4	3	2	녹	녹	원구
21	강	4	4	6	녹	녹	원구
22	중	5	3	8	자	녹	편구
23	중	8	3	6	자	자	원구
24	약	7	2	6	분리	녹	원구
25	중	3	2	4	자	녹	편구
26	약	3	4	4	자	녹	편구
27	중	2	2	4	녹	녹	편구
28	강	7	2	4	분리	녹	원구
29	강	2	3	4	분리	녹	편구
30	중	4	3	6	녹	녹	원구
31	중	5	4	2	녹	녹	원구
32	중	3	2	6	분리	녹	편구
33	강	3	3	4	자	녹	원구
34	약	6	2	4	분리	녹	원구
35	중	3	2	2	분리	녹	원구

* 흑부병 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

* 좁나방 저항성: 1(약)-9(강)

표 18. 양배추 유전자원 특성표(계속)

NO	초세	흑부병 저항성	Club root 저항성	좁나방 저항성	배축색	엽색	결구형
36	강	4	2	2	분리	녹	원구
37	중	2	2	4	분리	녹	편구
38	중	5	3	6	녹	녹	원구
39	강	4	2	6	자	녹	원구
40	중	4	2	6	녹	녹	원구
41	중	5	4	4	분리	녹	원구
42	강	6	2	2	녹	녹	원구
43	강	6	2	4	분리	녹	편구
44	중	5	3	4	자	녹	원구
45	중	2	4	6	녹	녹	편구
46	약	4	2	4	분리	녹	원구
47	강	4	4	2	자	녹	편구
48	강	4	3	2	분리	녹	편구
49	중	7	3	4	녹	녹	편구
50	중	6	3	4	자	녹	편구
51	강	5	4	6	분리	녹	편구
52	중	3	3	6	녹	녹	편구
53	강	7	2	4	분리	녹	편구

* 흑부병 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

* 좁나방 저항성: 1(약)-9(강)

표 19. 양배추 유전자원 특성표(계속)

NO	초세	흑부병	Club root	좁나방	배축색	엽색	결구형
		저항성	저항성	저항성			
54	중	4	5	4	녹	녹	편구
55	중	3	3	4	녹	녹	원구
56	강	3	4	6	녹	녹	원구
57	강	7	3	6	분리	녹	원구
58	중	6	2	6	분리	녹	원구
59	중	5	2	6	분리	녹	편구
60	중	4	4	8	자	녹	편구
61	중	3	4	4	녹	녹	편구
62	강	4	3	6	녹	녹	편구
63	중	7	2	4	녹	녹	편구
64	약	3	3	4	자	녹	편구
65	강	4	4	6	분리	녹	원구
66	강	6	4	4	분리	녹	편구
67	중	3	4	6	분리	녹	편구
68	중	7	3	4	녹	녹	원구
69	중	6	3	4	자	녹	원구
70	중	4	4	4	녹	녹	편구

* 흑부병 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

* 좁나방 저항성: 1(약)-9(강)

표 19. 양배추 유전자원 특성표(계속)

NO	초세	흑부병 저항성	Club root 저항성	좁나방 저항성	배축색	엽색	결구형
71	중	3	2	4	분리	녹	편구
72	약	2	2	4	녹	녹	편구
73	강	4	4	4	자	녹	원구
74	강	6	4	2	자	자	원구
75	중	4	2	2	녹	녹	원구
76	강	3	4	4	녹	녹	편구
77	중	5	2	6	녹	녹	원구
78	약	5	2	8	분리	녹	원구
79	약	4	2	4	분리	녹	원구
80	중	7	4	6	분리	녹	편구
81	중	3	2	6	분리	녹	원구
82	약	4	4	2	분리	녹	원구
83	약	2	3	6	분리	녹	원구
84	강	6	5	2	자	녹	편구
85	중	4	3	4	자	녹	원구
86	약	5	4	6	분리	녹	편구
87	중	7	3	4	분리	녹	원구

* 흑부병 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

* 좁나방 저항성: 1(약)-9(강)

표 19. 양배추 유전자원 특성표(계속)

NO	초세	흑부병 저항성	Club root 저항성	좁나방 저항성	배축색	엽색	결구형
88	중	7	2	2	분리	녹	원구
89	약	6	5	6	자	녹	편구
90	강	8	4	4	분리	녹	편구
91	중	5	3	4	자	녹	편구
92	약	4	3	4	녹	녹	원구
93	강	6	3	6	녹	녹	편구
94	강	6	2	6	녹	녹	원구
95	약	4	4	4	분리	녹	편구
96	중	7	2	6	녹	녹	편구
97	중	4	3	6	분리	녹	원구
98	강	3	2	4	녹	녹	편구
99	강	3	3	8	분리	녹	원구
100	중	3	3	6	자	녹	편구
101	약	4	4	6	분리	녹	원구
102	중	3	3	4	자	자	원구
103	약	5	3	4	분리	녹	원구
104	중	6	4	4	자	녹	편구
105	강	6	2	6	분리	녹	원구

* 흑부병 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

* 좁나방 저항성: 1(약)-9(강)

표 19. 양배추 유전자원 특성표(계속)

NO	초세	흑부병 저항성	Club root 저항성	좁나방 저항성	배축색	엽색	결구형
106	중	4	3	8	녹	녹	원구
107	강	2	2	6	분리	녹	편구
108	강	4	2	2	녹	녹	편구
109	약	4	2	4	분리	녹	원구
110	강	4	4	4	분리	녹	편구
111	강	6	3	6	녹	녹	편구
112	강	4	4	6	분리	녹	편구
113	중	3	2	4	분리	녹	원구
114	중	5	4	2	자	녹	원구
115	중	6	6	4	녹	녹	편구
116	약	4	4	8	자	녹	원구
117	강	7	4	4	녹	녹	편구
118	중	4	4	6	분리	녹	원구

* 흑부병 저항성: 1(약)-9(강)

* Club root 저항성: 1(약)-9(강)

* 좁나방 저항성: 1(약)-9(강)

제 4 장 식물체 재분화 및 원형질체 분리조건

제 1 절 식물체 재분화 체계확립

1. 식물생장조절제가 식물체 재분화에 미치는 효과

종속간의 체세포잡종기술의 전제는 식물의 재분화 체계의 확립이다. 이러한 재분화 조건을 확립하기 위하여 수집한 유전자원들을 기내에서 재분화 실험을 수행하였다. 재분화에 이용된 식물체의 부위로는 하배축, 자엽 및 본엽을 이용하였다. 종자는 30% 시판되는 유한 락스에서 15분동안 표면 살균한 다음 멸균수로 세 번 세척하여 MS배지에 계대 배양하였다. 식물체 재분화 유도하기 위하여 이용된 식물생장 조절제로는 BAP, NAA, Zeatin, IAA이다.

식물 조직배양사 배양절편이나 형성된 캘러스 조직으로부터의 신초 형성을 유기하는 것은 매우 중요하다. 신초 형성에 영향을 주는 요인들은 재료의 생리적 상태, 조직의 연령과 재생력, 절편체의 크기, 식물생장조절제의 농도, 배지의 조성들이 있다. 본 연구는 원형질체 융합을 통한 종속간의 체세포잡종기술이라는 데 초점을 두고 원형질체 분리재료로 이용되는 부위, 그리고 배지의 종류에 따른 식물체 재분화 조건확립을 위한 실험들을 수행하였다. 식물체 재료는 원형질체의 분리 및 배양조건과 같게 하기 위하여 파종 4일 후 배추의 하배축과 자엽, 혹은 계대배양 3-4주 후의 본엽을 사용하였다. 하배축의 경우는 NAA 1.0mg/l과 BAP 3.0mg/l의 조합에서 30.9%로 가장 좋은 재분화율을 보였으며 자엽의 경우는 NAA 0.5mg/l와 BAP 3.0mg/l의 조합에서 21.1%로 가장 높았다. 이것을 바탕으로 하여 배추와 브로컬리 그리고 케

일을 재분화 실험의 재료로 이용하여 재분화율을 조사하였다. 실험결과는 표20, 21와 그림 2와 같다.

표 20. 식물생장조절물질과 절편체에 따른 배추의 재분화율

처리(mg/l)	절편체(개) 신초(개)		재분화율(%)
하배축			
NAA 0.5+BAP 2.0	100	17	17.0
3.0	100	19	19.0
5.0	110	23	20.0
NAA 1.0+BAP 2.0	110	26	23.6
3.0	110	34	30.9
5.0	100	22	22.0
자엽			
NAA 0.5+BAP 2.0	90	6	6.7
3.0	90	11	21.1
5.0	90	9	10.0
NAA 1.0+BAP 2.0	90	5	5.6
3.0	90	11	12.2
5.0	90	13	14.4

표 21. 배추와 브로콜리의 재분화율

Breeding lines	I		II	
	절편체수	신초(%)	절편체수	신초(%)
Chinese cabbage	48	17(35.4)	48	19(39.6)
Broccoli	60	31(51.4)	70	17(24.2)
rapeseed	60	22(36.7)	50	9(18.0)

I : NAA 0.5mg/l+BAP 2mg/l+AgNO₃ 1mg/l

II: NAA 1mg/l+BAP 3mg/l+AgNO₃ 1mg/l

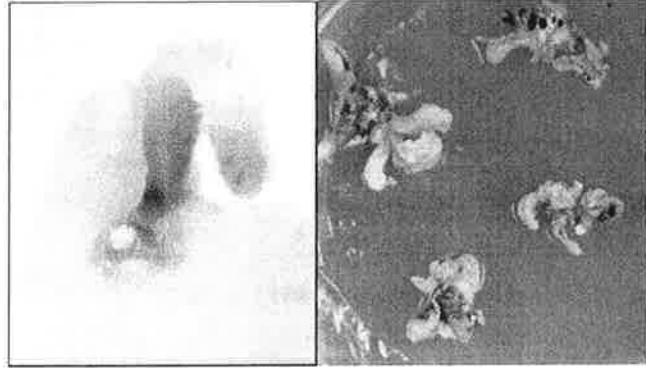


그림 2 배추와 브로컬리의 재분화

2. AgNO_3 의 처리가 식물에 재분화에 주는 영향

에틸렌 가스는 식물의 노화를 촉진하는 작용을 하는데 식물의 재분화에도 직접적으로 영향을 주는 요인 중의 하나이다. AgNO_3 를 재분화 배지에 첨가하면 에틸렌 가스의 생성을 억제하여 주기때문에 재분화 효율을 높여준다는 보고들에 근거하여 재분화 배지에 1-3mg/l의 AgNO_3 를 첨가하여 실험을 수행하였다.

AgNO_3 를 0.03-3mg/l의 농도를 처리하였을 때 하배측에서는 농도별 처리에서 식물체의 재분화율은 조금씩 높아지나 재분화율이 높아짐에 따라 vitrified 식물체들도 상대적으로 증가되는 현상을 관찰할 수 있었다. 3mg/l의 농도에서는 재분화율이 가장 높기는 하였지만 재분화 식물체의 투명화 현상도 증가되었다.

자엽을 실험재료로 이용하였을 경우 $AgNO_3$ 의 농도의 변화에 따른 재분화 효율의 차이가 뚜렷하지 않았으며 오히려 낮은 농도에서 재분화율이 높은 것으로 나타났다. 그리고 하배측을 이용하였을 때와 마찬가지로 자엽을 실험재료로 이용한 재분화 실험에서도 농도가 높아짐에 따라 식물체의 투명화 현상이 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다. (표22)

재분화 실험에 사용된 배지는 MS 3%배지에 NAA 1mg/l, BAP 3mg/l가 첨가된 것이다.

표 22. $AgNO_3$ 처리가 배추의 재분화에 미치는 영향

B처리 (mg/l)	절편체수	재분화율 (%)	vitri-fied 식물체 (%)	정상적인 재분화식물체
하 배 측				
$AgNO_3$ 의 0.03	89	3.0	0.0	3.0
0.3	122	7.0	1.0	6.0
1	112	26.0	0.0	26.0
2	99	23.0	3.0	20.0
3	112	26.7	7.1	19.8
자 엽				
$AgNO_3$ 0.03	30	0.0	0.0	0.0
0.3	30	16.7	0.0	16.7
1	40	15.0	0.0	15.0
2	40	15.0	2.5	12.5
3	40	15.0	5.0	10.0

3. Genotype에 따른 식물체 재분화

다양한 Genotype중의 가장 적합한 식물재료를 선택하는 것은 실험의 성공여부에 아주 중요한 작용을 한다. 본 실험에서는 중앙종묘(주)에서 분양 받은 순계 line 들 중에서 재분화율이 가장 높으면서 좋은 형질을 가지고 있는 재료를 선택하고자 식물재료들의 재분화 실험을 수행하였다.

배추와 브로콜리 kale 등 17 line 들이 재분화 실험의 식물재료로 이용되었으며 배지는 2% sucrose MS 기본배지에 NAA 0.5mg/l, BAP 2mg/l AgNO₃ 1mg/l와 NAA 1mg/l, BAP 3mg/l AgNO₃ 1mg/l이 첨가된 두 가지 조합으로 실험하였다. 실험에 이용된 절편체수는 20-90개이다. 4주 후 실험결과들을 조사하였다.

각 Genotype들의 재분화율을 비교한 결과 배추와 브로콜리중 브로콜리의 재분화율이 배추보다 훨씬 높았다. kale과 rape seed의 재분화율도 배추와 비슷하였다.

12 line 의 배추의 재분화율을 비교하였을 때 kw1, kw2, kw9이 비교적 높은 재분화율을 보였는데 kw2는 22.5%, kw1이 20%, kw9가 35.4%로 가장 높았으며 브로콜리에서는 kw13에서 61.1%의 아주 높은 재분화율은 보였다.

두가지 배지조합에서 재분화율을 비교하였을 때 각 genotype의 재분화 경향은 비슷하였다. 식물체의 재분화율은 배지조성이나 식물생장조절제의 영향도 크지만 식물체 자체의 특성 즉 genotype이 재분화 효율에 큰 영향을 준다고 생각된다(표 23).

재분화 실험의 결과에 근거하여 원형질체 융합에 이용될 식물재료들로는 배추에서 kw9, kw23, 브로콜리에서는 kw11, kw13을 선택하고자 하였다.

표 23. Genotype에 따른 식물체재분화 효율

Breeding line	I		II		
	절편체수	재분화율	절편체수	재분화율	
배추	kw1	65	13(20.0)	74	26(35.1)
	kw2	40	9(22.5)	40	17(42.5)
	kw3	40	1(2.5)	31	4(5.0)
	kw4	10	0(0.0)	7	0(0.0)
	kw5	10	0(0.0)	10	0(0.0)
	kw6	38	1(2.6)	38	4(10.5)
	kw9	48	17(35.4)	48	19(39.4)
	kw10	20	0(0.0)	30	0(0.0)
	kw23	33	6(18.2)	22	5(22.7)
	kw24	20	1(5.0)	50	0(0.0)
브로콜리	kw11	60	31(51.7)	70	17(24.2)
	kw12	40	19(47.5)	50	21(42)
	kw13	90	55(61.1)	80	45(56.3)
kale	kw15	50	3(6.0)	40	10(25.0)
rapeseed	kw16	60	22(36.7)	50	9(18.0)

4. 식물체 본엽을 이용한 식물체 재분화

일반적으로 자엽과 하배축이 재분화율이 높기 때문에 조직배양에 적합한 실험재료로 인정되어 널리 사용되고 있다. 원형질체 분리실험은 한번에 1g 정도의 식물재료를 필요로 하는데 만약 본엽을 실험재료로 사용한다면 많은 실험재료를 확보할 수 있기 때문에 실험의 효율성을 높일 수 있다.

본엽을 이용하였을 성장조절제의 농도별 처리에서 식물체의 재분화 효율

의 차이를 관찰할 수 있었고 MS 배지와 Kao 배지를 사용하였을 때 재분화율의 차이를 관찰할 수 있었다.

실험에 이용된 절편체는 100개였으며 한 petri dish 당 20개의 절편체를 치상하여 5반복으로 수행하였으며 재분화된 식물체의 개수를 조사하여 PC-SAS program을 사용하여 Duncan의 다중검정을 수행하였다.

호르몬 농도별 처리에서 MS배지에 zeatin 2mg/l, BAP 1mg/l, NAA 1mg/l 를 혼용 처리하였때 배추(kw23)에서 55%의 가장 높은 재분화율을 보였으며, CrGC 계통들에서는 CrGC4-3이 64%의 높은 재분화율을 보였다. MS 배지와 Kao 배지를 비교하였을 때, Kao 배지에 2mg/l zeatin, 0.5mg/lBAP , 1mg/l NAA 를 첨가하였을 때 85%의 아주 높은 재분화율을 보였다.(표 24,25)

표24. 농도별 식물성장조절제 처리에서 식물체 재분화효율의 비교

Medium	Genotype	kw23	Yellow spring	CrGC3-8	CrGC4-3
	2M		55 ^a	11 ^a	15 ^a
2K		46 ^a	9 ^a	20 ^a	76 ^a
3M		10 ^a	0 ^b	7 ^b	48 ^b
3K		0 ^b	15 ^a	25 ^a	85 ^a

^{a, b} : Means with different superscripts in the same column are significantly different(p<0.05.)

2M: MS+2mg/l zeatine+1mg/lBAP+1mg/lNAA

2K : Kao+2mg/l zeatine+1mg/lBAP+1mg/lNAA

3M: MS+2mg/l zeatine+0.5mg/lBAP+1mg/lNAA

3K: Kao+2mg/l zeatine+0.5mg/lBAP+1mg/lNAA

표 25. 생장조절제 처리가 식물체 재분화에 미치는 영향

Genotype Combination	Regeneration frequency(%)				
	kw23	Yellow spring	kw26	kw27	kw28
1M	0 ^c	9 ^a	0	1 ^a	3 ^a
2M	55 ^a	11 ^a	0	2 ^a	0 ^a
3M	10 ^b	0 ^b	0	2 ^a	0 ^a
1M	0 ^b	9 ^a	0	1 ^a	3 ^b
4M	8 ^a	0 ^b	0	0 ^a	2 ^b
5M	2 ^a	0 ^b	0	0 ^a	20 ^a
1M	0 ^a	9 ^a	0	1 ^a	3 ^a
6M	0 ^a	0 ^b	0	0 ^a	0 ^a

^{a, b} : Means with different superscripts in the same column are significantly different(p<0.05)

- 1M: 2mg/l Zeatine+2mg/lBAP+1mg/lNAA
- 2M: 2mg/l Zeatine+1mg/lBAP+1mg/lNAA
- 3M: 2mg/l Zeatine+0.5mg/lBAP+1mg/lNAA
- 4M: 2mg/l BAP+1mg/lZeatine+1mg/lNAA
- 5M: 2mg/l BAP+0.5mg/lZeatine+1mg/lNAA
- 6M: 2mg/l BAP+2mg/lZeatine+0.5mg/lNAA

표 25. 생장조절제 처리가 식물체 재분화에 미치는 영향 (계속)

Genotype Combination	Regeneration frequency(%)			
	CrGC3-1	CrGC3-7	CrGC3-8	CrGC4-3
1M	0 ^p	0 ^a	0 ^c	14 ^c
2M	2 ^b	5 ^a	15 ^a	64 ^a
3M	17 ^a	7 ^a	7 ^b	48 ^b
1M	0	0 ^c	0 ^a	14 ^a
4M	0	37 ^a	0 ^a	7 ^b
5M	0	24 ^b	5 ^a	2 ^c
1M	0 ^a	0 ^a	0 ^a	14 ^a
6M	0 ^a	5 ^a	4 ^a	0 ^b

^{a, b} : Means with different superscripts in the same column are significantly different(p<0.05)

- 1M: 2mg/l Zeatine+2mg/lBAP+1mg/lNAA
- 2M: 2mg/l Zeatine+1mg/lBAP+1mg/lNAA
- 3M: 2mg/l Zeatine+0.5mg/lBAP+1mg/lNAA
- 4M: 2mg/l BAP+1mg/lZeatine+1mg/lNAA
- 5M: 2mg/l BAP+0.5mg/lZeatine+1mg/lNAA
- 6M: 2mg/l BAP+2mg/lZeatine+0.5mg/lNAA

제 2 절 원형질체 분리 및 배양조건 구명

1. 원형질체 분리

원형질체를 분리하기 위하여 사용한 식물재료로는 중앙종묘에서 분양받은 재료들과 CrGC계통들이다.

원형질체의 분리정도는 여러 가지 요인의 영향을 받고 있지만 이들 중에서도 가장 중요한 것은 원형질체를 분리하려고 하는 식물체의 생리적 상태, 효소의 선택, 분이용액의 조성, 삼투안정제의 종류와 농도가 있다.

원형질체 분리를 위한 식물체 재료를 전처리용액에서 메스로 잘게 잘라 암상태에 1-3시간동안 처리하였다. 다음 전처리용액을 제거하고 10ml 정도의 효소용액을 넣어 rotary shaker에서 약하게 흔들어주면서 효소용액과 식물조직이 충분히 반응하도록 효소와 식물체의 반응시간은 16-18시간이 가장 적합하다는 보고들이 많이 되어 있지만 효소의 종류와 농도에 따라 처리시간이 달라질 수도 있다고 하였다.

본 연구에서는 배추와 브로콜리 등 십자화과 채소의 원형질체 분리에 가장 적합한 삼투조절제의 농도, 효소의 농도, 효소처리시간, 및 온도의 최적 조건을 찾아 원형질체 분리 및 배양의 체계를 확립하고자 실험들을 수행하였다. 식물체 조직으로부터 원형질체를 분리 정제하는 과정을 그림으로 표시하면 다음과 같다(그림 3).

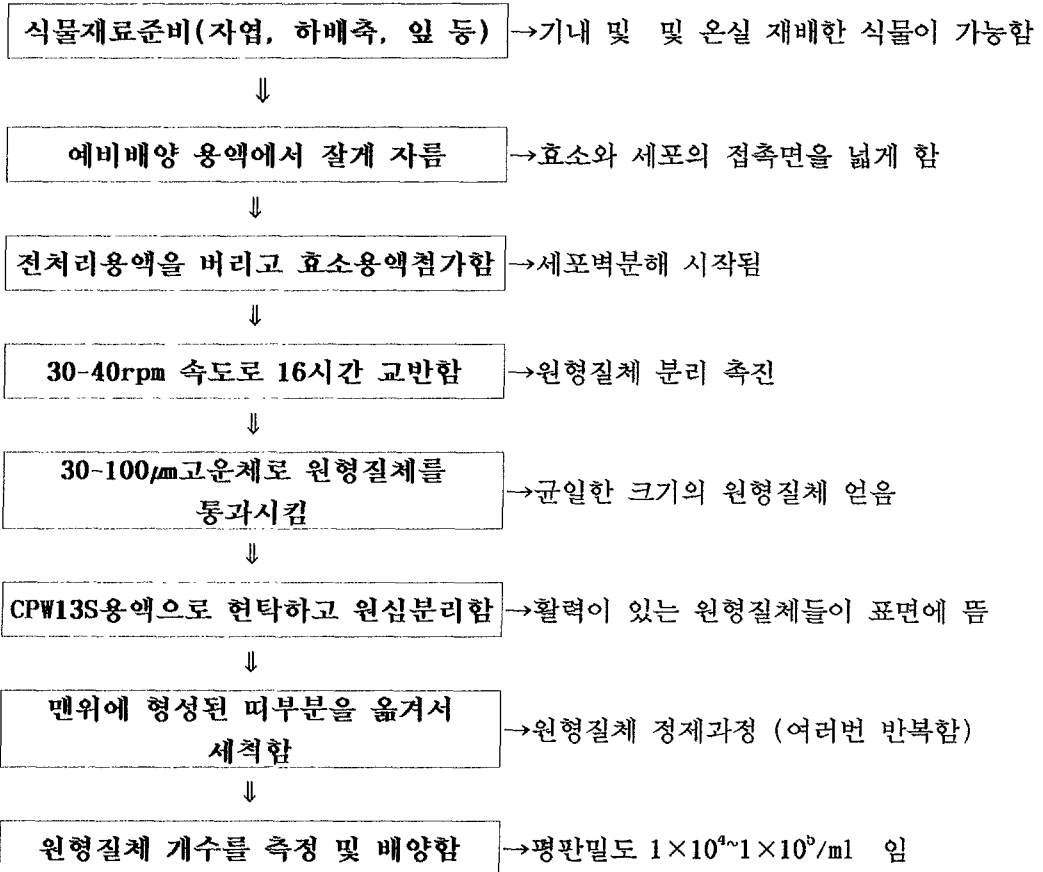


그림 3. 원형질체 분리하는 과정

십자화과 원형질체 분리에 가장 적합한 Enzyme의 종류를 알아보기 위하여 일본 yakult 사의 효소보다 미국의 calbiochem의 효소를 비교하여 실험하였는데 미국의 calbiochem의 효소가 십자화과 원형질체 분리에 더 효과적인 것으로 나타났으며 효소는 cellulysin 과 macerozyme을 혼합하여 사용하였다.

원형질체 분리를 위한 최적 효소의 농도를 밝히기 위하여 cellulysin과 macerozyme을 농도별로 처리하여 원형질체 개수를 측정하였다. (표 26, 27)

표 26. 효소농도별 처리시 원형질체수

	E1	E2	E3	E4	E5
cellulysin	1%	1%	0.5%	0.5%	1%
macerase	0.1%	0.5%	1%	1%	1%
solution	K3 medium			BSA 0.2% 첨가	
osmotism	0.4M Sucrose PH 5.6-5.8				
protoplasts	5.1×10^9	1.2×10^9	7.9×10^9	2.9×10^9	6.1×10^9

표 27. 효소용액을 첨가 후 환경조건에 따른 분리결과

온도	23-24℃ (배양실 온도)			27-28℃			28℃
처리 시간	없음			16시간에서 24시간			6시간
Shaking 속도	20	30	40	20	30	40	30
처리 시간	16-24시간			16시간에서 24시간			동일
결과	1.2×10^4	2.1×10^4	3.35×10^4	2.5×10^4	1.72×10^5	5.1×10^5	6.5×10^5

위의 결과 E2의 효소용액을 사용하여 28℃ 항은 shaking 에 넣은 후 원형질체를 분리시켰을 때 가장 좋은 결과를 나타내었는데 이는 일반적으로 사용되는 효소 조합이 원형질체를 분리하는데 시간이 16-18(overnight)이 걸리는데 비하여 5-6시간만에 원형질체를 분리시킬 수 있어 실험의 시간을 줄여 연구의 효율을 높일 수 있었다. 그림 4에서 원형질체가 효소와 반응하여 세포벽이 제거된 후 원형질체가 분리되어 나온 것을 관찰할 수 있었다.

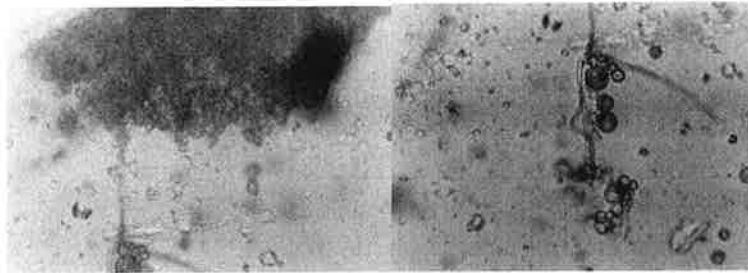


그림 4 효소처리후 제거된 세포벽에서 분리되어 나오는 원형질체
좌: 세포벽이 제거되면서 분리된 세포, 우: 원형질체가 완전히 분리됨

2. 원형질체의 정제와 배양

순수한 원형질체를 얻기 위하여 효소처리를 거친 용액들을 먼저 파이펫으로 잘 섞어서 붙어 있는 세포들을 떨어지게 한후 60um의 mesh를 이용하여 큰 세포찌꺼기들을 제거하였다. 체로 거른 용액들을 세포세척용액(CPW(Cell protoplast Washing)21S(표 28)으로 현탁하여 15ml의 원심분리 tube에 옮긴 후 1000rpm에서 10간 원심 분리하였다.

원심분리 후 tube의 윗 부분에는 짙은 색의 띠 모양의 부분이 생기는데 이 부분이 바로 순수하게 정제된 원형질체 부분이다. 파스퇴르 파이펫을 이용하여 띠 부분을 조심스럽게 취하여 다른 원심분리 tube에 옮긴 다음 세포세척용액(w5)으로 현탁하여 다시 원심 분리하였다. 이 과정을 반복하여 세포에 붙어 있는 효소용액을 충분히 세척하였다.

세척 후 윗 부분의 용액을 제거하고 pellet을 배양배지로 현탁하여 현미경하에서 혈구 계산기로 원형질체의 개수를 측정하여 배양밀도를 조절하였다. 원형질체 배양의 가장 적합한 밀도는 5×10^5 이라는 보고들이 있다.

세포밀도가 조절된 세포는 한 petri dish 당 1ml 정도씩 분주하여 배양하였다.

표 28. 원형질체 세척용액의 조성(CPW)

KH ₂ PO ₄	27.2mg/l
KNO ₃	101.0mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1480.0mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.0mg/l
KI	0.16mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025mg/l
	PH: 5.6-5.8

3. 원형질체의 배양

정제된 원형질체는 5×10^4 의 밀도로 k8p 6mm 지름의 작은 petri dish에 1ml씩 분주하여 25°C incubator에서 암 배양하였다. 5-7일후 원형질체가 활발하게 분열하기 시작하면 원형질체를 agarose 1.5%(최종)반고체 배지에 옮겨주었다. 여기에서 사용한 배지는 Glimelius team이 사용한 배지를 약간 수정하여 이용하였다. (표 29)

배지에 첨가한 식물생장조절제로는 2,4-D, BAP, NAA, Kinetin이다. 원형질체는 액체배지에서 배양 5일후에 왕성하게 분열하기 시작하였다.

일반적으로 원형질체 배양에서 가장 많이 이용되는 방법들로는 액체평판 배양방법, agarose bead 배양방법, alginate bead 배양 등 방법들이 있다. 본 연구에서는 십자화과 채소의 체세포잡종세포의 배양에 적합한 배양체계를 확립하기 위하여 위의 방법들을 비교하여 실험하였다. 모든 배양방법에서 배지에 첨가된 식물생장조절제의 농도를 초기 배양의 1/4로 낮추었다.

가. 액체 평판배양방법

액체평판배양방법은 배양도중에 신선한 배지를 수시로 공급해 줄 수 있을 뿐만 아니라 배지의 삼투 조절제를 조절 할 수 있어 세포의 분열을 증가시킬 수 있다고 arabidopsis 원형질체 및 무궁화 원형질체 배양에서 소개된 바가 있다. 십자화과 원형질체 배양에서 세포초기 배양에서는 액체평판배양방법이 효과적이었으나 시간이 지나면서 세포가 갈변하면서 분열이 정지되는 현상을 관찰 할 수 있었다.

표29. 십자화과 원형질체 배양에 이용된 K8p 배지조성

Major elements(mg/l)		Organic acids	mg/l
NH ₄ NO ₃	600	Sodium pyruvate	5
KNO ₃	1900	Citric acid	10
CaCl ₂ . 2H ₂ O	600	Maris acid	10
MgSO ₄ . H ₂ O	300	Fumaric acid	10
KH ₂ PO ₄	170		
KCl	300		
Minor elements (mg/l)		Vitamins	mg/l
KI	0.75	Myo-inositol	100
H ₃ BO ₄	3.0	Nicotinic acid	1
MnSO ₄ . H ₂ O	10.0	Pyridoxine HCl	1
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2.0	Thiamine HCl	10
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8	Folic acid	0.2
Na ₂ EDTA	37.3	Biotin	0.005
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	Ascorbic acid	1
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025		
Casein hydrolysate	125mg		
Coconut water	20ml		
Sugar			PH: 5.7
Glucose	72 g/l		
Sucrose	250 mg/l		
Fructose	250 mg/l		
Ribose	250 mg/l		
Xylose	250 mg/l		
Mannose	250 mg/l		
Rhamnose	250 mg/l		
Cellobiose	250 mg/l		
Sorbitol	250 mg/l		
Mannitol	250 mg/l		

나. Agarose 반고체 배양방법

Agarose 반고체 방법이란 일정기간동안 액체배지에서 배양된 세포가 분열을 시작하였을 때 세포를 0.15% agarose 배지에 옮겨 배양하는 방법인데 이 방법을 이용하여 세포의 갈변을 억제시킬 수 있었다.

다. Alginate 배양방법

Alginate 배양방법을 이용하여 세포를 배양하였을 때 초기 배양시 원형질체 분열정도가 agarose 배양보다 활발하였지만 갈변현상이 생기기 시작하였다.

세가지 방법을 비교하였을 때 액체배지에서는 세포가 분열하다가 심하게 갈변되어 더 이상 성장 하지 않는 현상을 관찰할 수 있었으며 10-20세포로 분열한 세포들을 agarose 반고체 배지에 옮겼을 때 세포들이 매우 빨리 성장하면서 연록색의 세포덩어리로 변하는 것을 관찰 할 수 있었으며 Alginate 배양방법에서는 초기 배양방법에서 분열이 왕성하게 일어나는 반면에 세포의 색깔은 연황색을 띠었으며 점차 갈변되어 가는 현상을 관찰 할 수 있었다.

이 결과로부터 미루어 보아 십자화과 원형질체배양에 있어서 초기에 액체배지에서 세포벽을 형성시키고 세포분열을 유기 시킨 다음 반고체 배지에서 배양하는 것이 세포의 분열능력을 증가시킬 뿐만 아니라 세포의 갈변을 억제시킬 수는 바람직한 방법이라고 생각한다.

분리된 원형질체와 그 원형질체가 분열하여 micro-calli로 되는 과정은 그림5와 같다.



그림 5. *B. juncea*(CrGC4-3)의 원형질체 및 분열된 세포
오른쪽: 분리정제된 원형질체 왼쪽:분열하고 있는 세포

4. 캘러스로부터 식물체 재분화

원형질체에서 얻어진 캘러스가 2-5mm 크기로 자라면 세포들을 재분화 배지에 옮겨준다. 재분화 배지는 MS 기본배지에 Sucrose농도는 3%이며 첨가한 식물생장조절제들은 BAP, Zeatin NAA, IAA이다. 캘러스에서 식물체는 multiple shooting이 형성되었다.

CrGC4-3의 원형질체는 분리되어서 60일후에 완전한 식물체로 재분화 되었다. 재분화된 식물체는 식물생장조절제가 없는 MS배지에 옮겨주었으며 재분화된 식물체는 기내에서 꽃이 필 수 있었다. 재분화된 식물체는 정상적인 식물체와 차이가 없었다.(그림 6)

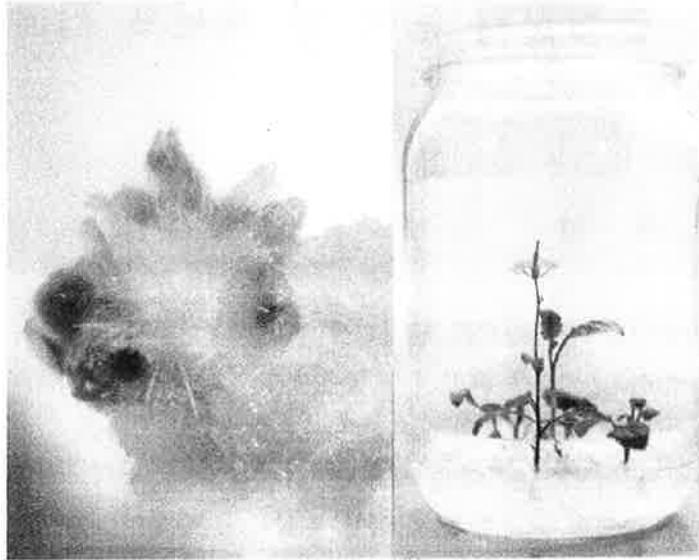


그림 6. 원형질체로부터 얻어진 캘러스에서 식물체가 재분화되는 과정 및
기내에서 개화한 재분화된 식물체

제 5 장 원형질체 융합 및 체세포 잡종 식물체 선발

제 1 절 서 설

체세포잡종이란 有性的으로 불화합성 (incompatibility)을 지니고 있어서 교잡육종이 불가능한 두 작물의 원형질체를 따로 분리한 다음, 융합을 시켜서 하나의 식물체로 재생시키는 기술이다. 융합된 원형질체의 세포벽이 재생되면서 하나의 세포가 된 다음 세포분열을 시작하게 된다. 적합한 기내배양 조건하에서 융합된 세포들은 완전한 식물체로 재생이 가능하며, 이렇게 해서 만들어진 식물체를 체세포잡종체 (體細胞雜種體:somatic hybrids) 라고 한다.

잎이나 하배축 같이 체세포로 구성된 조직이나 기관을 재료로 해서 원형질체를 배양하기 때문에 체세포잡종이라고 한다. 원형질체 융합을 통해서 얻어진 잡종식물체가 두 식물체간의 핵 수준에서의 재조합도 일어나지만 세포질 수준에서도 잡종식물체가 탄생하게 된다. 이러한 식물체를 세포질잡종 (細胞質雜種:cybrids) 이라고 한다. 특히 자가불화합성인 식물이나 모계유전으로 유전되는 세포질 용성불임성의 도입에 있어서 재래적인 교잡육종으로는 새로운 식물을 만들어내는 것이 불가능할 때 원형질체 배양이 매력적인 수단으로 이용될 수 있기 때문이다.

체세포잡종의 이점은 첫째로 인연이 떨어져 유성 적으로는 교잡이 안되는 다른 속이나 종 때로는 과 간의 교잡을 가능하게 함으로써 새로운 식물의 종을 만들 수 있고 둘째는 근연간에 유성적 생식이 되지 않거나 약하게 되는

작물을 개량하는데 이용될 수 있으며, 셋째는 유성적 잡종에서는 부친 쪽에서 염색체 유전자만이 교잡에 참여하고 엽록체와 미토콘드리아에 존재하는 세포질 유전자는 제외되지만 체세포잡종에서는 이들을 모두 이용할 수 있으므로 세포질 융성 불임성 계통의 형질을 이용할 수 있다.

이중에서 가장 매력적인 있는 분야는 새로운 종의 창조로 이것은 자연상태에서 유성적으로 이루어 질 수 없는 교잡을 인위적으로 하기 때문에 새로운 인자형을 무한히 만들어 낼 수 있다는 이론적인 근거를 가지고 있다.

관행 교잡육종에 의한 품종육성이 계속됨에 따라 유전자 자원의 고갈 현상이 나타나고 있다. 따라서 원연 야생종의 유용유전자의 도입이 절실 하다. 그러나 원연 간 또는 종속간의 교잡불화합성 (交雜不和合性 cross-incompatibility) 때문에 유용유전자의 도입이 사실상 어려운 실정이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 개발된 방법이 유성적인 방법으로는 배 배양이고 무성적인 방법으로는 원형질체 융합 방법이다. 원형질체 융합 방법은 관행 육종방법으로는 불가능한 종속간의 개념을 초월할 수 있는 방법이다.

제 2 절 원형질체 융합체계 확립

원형질체 융합체계를 확립하는 것은 체세포잡종식물체 생산의 기초이다. 세포융합방법에는 전기융합방법과 화학처리 방법 즉 PEG(Polyethylene glycol)을 이용하는 방법이 있는데 십자화과 식물의 원형질체의 막이 감자와 같은 식물에 비하여 단단하기에 관행적인 융합방법은 화학적 방법이다.

본 실험에서는 스웨덴의 Glimelius K 의을 약간 수정하여 사용하였다. 이때 사용한 PEG의 molecular weight(M.W)는 6000이다.

융합방법은 융합할 두 가지 혹은 세지 세포들을 같은 비율로 혼합하여 w5 세포세척용액으로 현탁한 다음 6mm 지름의 plastic petri dish 에 한 방울 혹은 7방울을 떨어뜨려 놓았다. 5 분후 세포 현탁액 위에 35-40%의 PEG 용액을 같은 volume 으로 조심스럽게 떨어뜨려 놓았다. 다시 5-10분이 지난 후 파스퇴르 pipets으로 용액을 조심스럽게 따라낸 후 배양배지로 한번 세척해준 후 다시 배지를 첨가하였다. 배지에는 2,4-D 1mg/l, 0.5mg/l BAP, 1mg/l NAA, 0.2mg/l kinetin을 첨가하였다. 배지가 증발하지 않도록 parafilm으로 sealing 하여 25℃의 incubator에서 암배양 하였다.

제 3 절 체세포잡종식물체의 선발

두 가지 세포가 혼합되고 융합되면 서로 다른 세포들 사이의 융합도 일어나지만 같은 종의 세포끼리 융합되는 가능성도 배제할 수 없다. 때문에 잡종세포 선발은 체세포잡종식물의 생산의 효율을 높이는 데 중요한 역할을 한다. 잡종세포를 선발하는 방법들은 서로 다른 부위의 원형질체를 융합함으로써 현미경하에서 선발할 수 있다

예를 들면 하배축의 원형질체는 엽록체가 적기 때문에 자엽이나 본엽에서 분리한 원형질체와 융합시키면 융합된 세포는 형태상으로 두가지 원형질체와 구별되기 때문에 현미경하에서 선발할 수 있다. 이외에도 형광염색 시약으로 염색하여 현미경하에서 선발하는데 본 연구에서는 원형질체를 RITC, Scopoletion 과 같은 염색시약으로 염색하여 (530nm의 파장)에서 관찰하였다. 그 결과 RITC에 의해 염색된 것 노란색을 띄었고, Scopoletion 으로 염색된 원형질체는 하늘색을 띄어 융합된 세포선발에 충분하게 이용될 수 있었다. (그림 7).

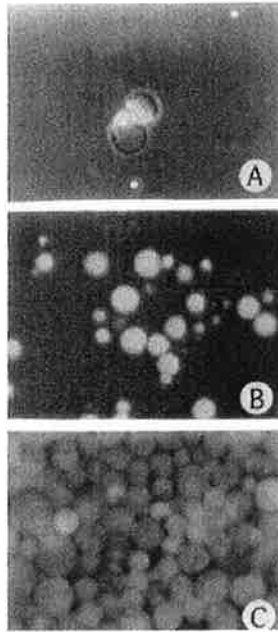


그림 7. 분리된 원형질체를 형광염색시약으로 염색
 A: 하배축과 엽육세포의 융합; B: RITC 에 의한 염색
 C: Scopolentin에 의한 염색된 원형질체

이러한 원리를 이용한 Cell sorting 방법을 이용한 잡종식물체의 선발은 시간이 적게 들고 효율적이기는 하지만 기계의 가격이 부담되며 두 가지 세포를 염색한 후 융합하여 현미경에서 선발하는 방법은 시간이 많이 걸리고 염색 시약이 세포에 타격을 주기 때문에 세포의 생장에 영향을 주어 세포의

재분화 효율에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

원형질체를 융합한 후 선발을 거치지 않은 상태에서 배양하여 식물체를 재분화를 유도하고 재분화된 식물체의 특성검정결과로부터 체세포잡종식물체를 선발 확인하는 것도 바람직한 방법이라고 사료된다.

본 연구에서는 잡종식물체의 선발은 세포배양 초기에 진행한 것이 아니라 재분화된 식물체의 배수성검정, 염색체수 관찰방법, RAPD 방법들을 이용하여 융합여부를 확인하고 잡종식물체를 선발하였다.

제 6 장 배추와(*B. campestris*) 와 브로콜리 (*B. oleracea*)의 체세포잡종 식물체 생산

제 1 절 서 설

체세포 잡종방법은 식물에 있어서 유전자의 다양성을 제공할 수 있는 아주 중요한 방법이다. 지금까지 종속간에 체세포잡종 식물체는 여러 가지 실험들을 통하여 생산되었다. 원형질체 융합을 통하여 생산된 식물체는 핵내 유전자와 세포질내소기관의 유전자의 재조합들이 일어나기 때문에 융합 산물들이 다양하게 나타날 확률이 높다.

원형질체가 융합되면 다음과 같은 현상들이 나타날 수 있다. 즉 원형질체가 융합하면 Genome들이 다양하게 나타날 수 있는데 아래의 그림 3에서 보듯이 서로 다른 두 가지 세포가 융합되면 처음에는 이핵체의 형태로 융합되었다가 세포벽이 만들어지고 세포분열이 전착됨에 따라 핵 과 세포질 계층들이 다양하게 분포된 잡종식물체들을 얻을 수 있다 (그림 8).

원형질체 융합으로부터 얻어진 세포는 감자 와 토마토로부터 온 DNA를 가지고 있는 핵, 엽록체와 마이토콘드리아 등 세포소기관의 혼합체 가지고 있다. 유전조성이 다른 양친 사이의 세포융합 산물은 양친의 엽록체와 마이토콘드리아를 포함하는 세포질을 가진 2 개 또는 그 이상의 핵을 가진 헤테로케리온 (heterokaryon: 異質多核體) 이다. 헤테로케리온들은 세포가 분열함에 따라 여러 가지 다른 조합의 잡종, 즉 세포질잡종 (cybrid) 또는 잡종 (hybrid) 이 된다 (그림 9).

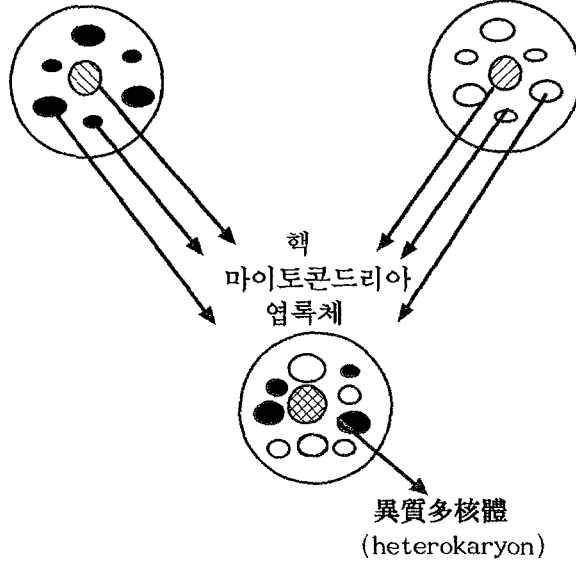
세포질 잡종은 엽록체와 마이토콘드리아의 새로운 조합, 즉 한 양친의

세포질이 다른 양친의 세포질에 의하여 대체된 잡종 형태이다. 전통적인 교배방법으로는 이러한 엽록체와 미토콘드리아의 조합을 얻기 힘든 이유는, 세포질 유전은 모계에 의해서 유전되기 때문에 엽록체와 미토콘드리아는 항상 같이 움직이기 때문이다. 만약, 한쪽 친의 핵 염색체 일부가 삭제되면 비대칭융합 같은 부분잡종이 만들어 질 수도 있다.

이질 다핵체는 계속해서 분리가 일어나게 되는데 엽록체 DNA는 거의 재조합을 하지 않고, 다음 세포분열에서 양친 중 한쪽으로부터 분리되는 반면, 미토콘드리아 DNA 사이에는 재조합이 일어나게 된다 (그림 8).

세포A (배추)

세포B (양배추)



융합직후의 세포질잡종

(세포질유전자로서 양친에서 온 미토콘드리아 및 엽록체 게놈이 섞여있음)

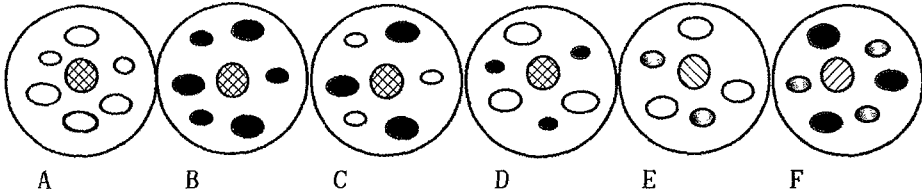


그림 8. 원형질체융합으로 나타날 수 있는 가능한 잡종 세포 형태들

- A: 핵 A+B, 엽록체 B, 미토콘드리아 B : hybrid
- B: 핵 A+B, 엽록체 A, 미토콘드리아 A : hybrid
- C: 핵 A+B, 엽록체 A, 미토콘드리아 B : hybrid
- D: 핵 A+B, 엽록체 B, 미토콘드리아 A : hybrid
- E: 핵 A, 엽록체 A, 미토콘드리아 A+B : cybrid
- F: 핵 B, 엽록체 B, 미토콘드리아 A+B : cybrid

제 2 절 *B. campestris*(배추) 와 *B. oleracea* (브로콜리)의 체세포잡종식물체 생산

1. 서론

국민들의 식생활이 개선되고 고급화함에 따라 채소의 이용과 보건의 효능에 대한 관심이 고조되고 국제화의 시대에 따른 신선한 샐러드용 채소의 수요의 증가는 채소 종류의 다양화를 가속화 시키고 있다. 십자화과 채소에서도 단순 김치의 재료로 배추에 대한 소비뿐만 아니라 브로콜리, 컬리플라워의 소비도 증가하고 있는 추세이다.

*B. campestris*에는 배추 청경채, 케일 등 포함되어 있으며 *B. oleracea*에는 양배추, 브로콜리, 컬리플라워 등이 포함되어 있다.

브로콜리는 우리 나라에서 육성되고 있으나 주로 일본 미국 등지에서 수입해서 재배한다. 브로콜리는 녹색채소 가운데 가장 영양가가 높은 채소이다.

최근 미국 농무부 농업연구청 (Agricultural Research Service) 과학자들은 셀레늄 성분이 높은 배지에서 키운 브로콜리를 쥐에게 먹었을 때 대장암의 초기 단계가 놀라우리 만치 감소한 것을 발견했다. ARS 영양학자들은 John Finley와 Cindy Davis는 음식에 들어있는 형태나 또는 셀레늄 염과 달리 브로콜리에 들어있는 셀레늄의 형태가 암에 대해서 보다 강력하다는 보고서들을 주목했다. 그 브로콜리 형태는 이른바 셀레늄 메칠 셀레노시스테인 (selenium methyl selenocysteine) 또는 SemSC 이다.

몸은 이 아미노산 끝을 잘라내어서 메칠 셀레놀 (methyl selenol)이라는 항암 인자를 만들어낸다. 곡물과 몇몇 육류에 많은 셀레늄의 형태는 여러번 화학적인 전환을 거쳐야 메칠 셀레놀이 될 수 있다. 그러나 브로콜리에 들어

있는 형태는 단 한번이면 된다. 또한 암을 예방하는데 효능이 있는 자연 화합물(natural compounds)을 다량으로 함유하는 슈퍼-브로콜리(super-broccoli)가 영국 학자들에 의해 개발되었다는 보고들이 연속적으로 보도되어 앞으로 세계적으로 브로콜리에 대한 소비가 급증할 추세이다.

2. 실험재료 및 원형질체 분리, 융합, 배양방법

배추와 브로콜리의 체세포잡종식물생산에 이용된 식물재료로는 중앙종묘(주)에서 분양 받은 배추(kw9)와 브로콜리(kw11)이다. 이 두가지 계통들은 재분화 실험에서 높은 재분화율을 보였다.

종자는 표면 살균하여 기내에 파종하였으며 파종 3-5일 정도 자엽과 하배축을 사용하였으며 본엽은 기내에 계대배양하여 2-3주 지난 어린잎을 사용하였다. 분리 정제된 원형질체는 세척용액으로 1×10^6 protoplasts/ml 의 밀도를 조절한 다음 각각 1:1의 비율로 혼합하여 6mm 지름의 petri dish 에 떨구어 40% PEG 로 융합시켰다. 융합된 세포들은 배양 2일 후부터 분열하기 시작하면 agarose 반고체 배지에 옮겨준다. 작은 세포덩어리들이 육안으로 보여질 때 petri dish 세포들은 약 광하에 옮겨 배양하였다. 배양된 세포들은 39일후 많은 양의 캘러스를 얻었는데 얻어진 캘러스는 MS 배지에 식물생장 조절제를 처리하여 재분화를 유지시켰다.

재분화된 식물체는 발근시킨 다음 포트에 순화시켜 특성을 조사하고 교배하여 종자를 얻으려고 하였다(그림 9)

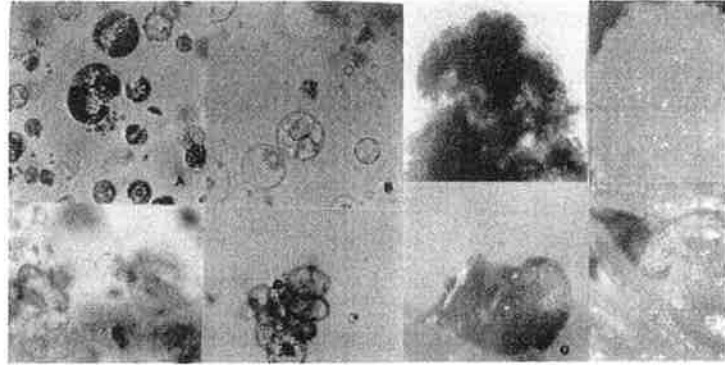


그림 9 배추와 브로콜리의 세포융합 및 식물체가 재분화되는 과정
 A: 원형질체분리 B, C: 원형질체분열, D, E, F: 형성된 캘러스
 G, H: 캘러스로부터 식물체 재분화

3. RAPD 방법에 의한 융합여부의 검증

원형질체 융합된 캘러스에서 재분화된 식물체의 융합여부를 검증하기 위하여 Operon Primer B08을 사용하여 융합여부를 검증하였다. PCR의 반응조건은 92℃ 1min, 40℃ 1min, 72℃에서 2min, 을 하여 30cycl로 진행하였으며 72℃에서 30분 유지 시켰다. PCR 산물은 1% agarose gel 에 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 검증결과 재분화된 융합체 중 하나가 다른 밴드양상을 보이고 있을 뿐 다른 개체들 모두가 배추와 브로콜리의 특이한 밴드를 가지고 있는 것을 미루어 보아 세포융합체임을 확인 할 수 있었다. (그림 10)



그림 10. RAPD 분석방법에 의한 세포융합체의 밴드양상
(1: kw9; 13: kw11, 2-11: 체세포잡종식물체)

4. Flow cytometry 분석에 의한 체세포잡종식물체 확인

융합된 식물체여부를 검증하기 위하여 ploidy analyser를 이용하여 분석하였다. 실험재료는 기내에서 성장한 같은 조건의 식물체의 같은 부위의 잎을 이용하였으며 잎은 잘게 잘라서 전처리 과정을 걸쳐 배수성 분석기에 주입시켜 분석하였다. 검증결과 브로콜리와 배추의 융합조합에서는 핵내 DNA 양으로부터 식물체들이 융합체임을 확인할 수 있었다 (그림 11-12).

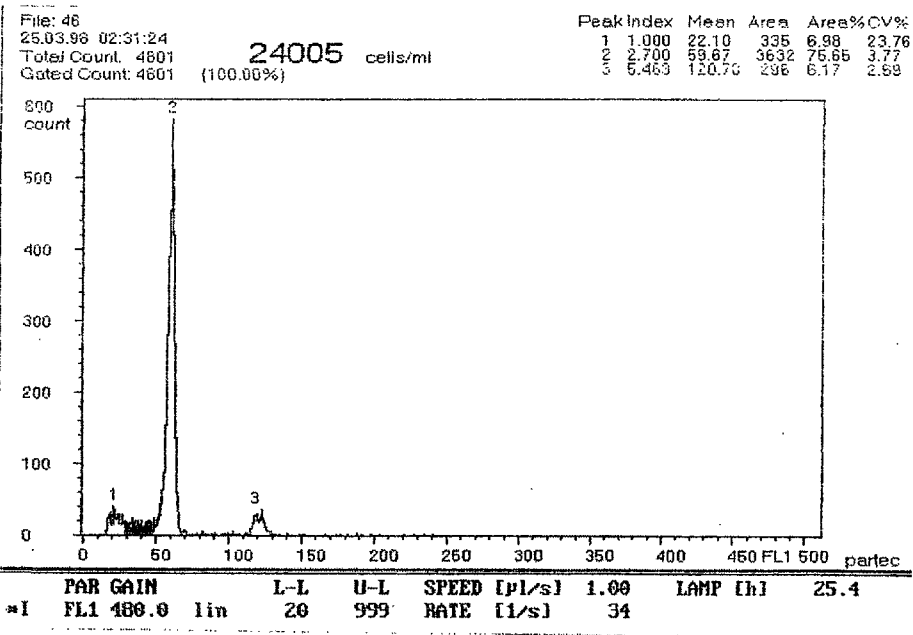
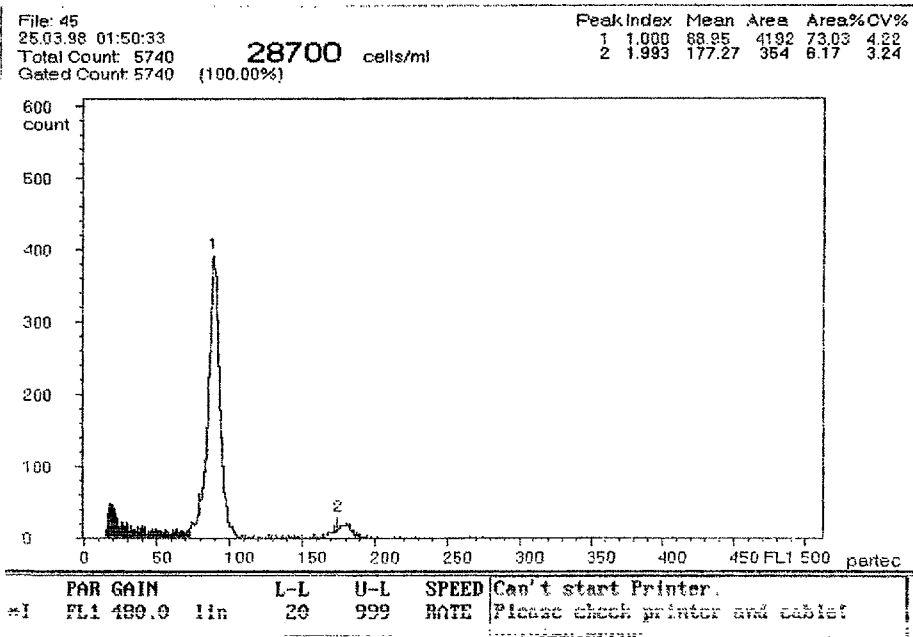


그림 11. 세포융합재료인 배추와 브로콜리의 배수성

상: 배추 하: 브로콜리

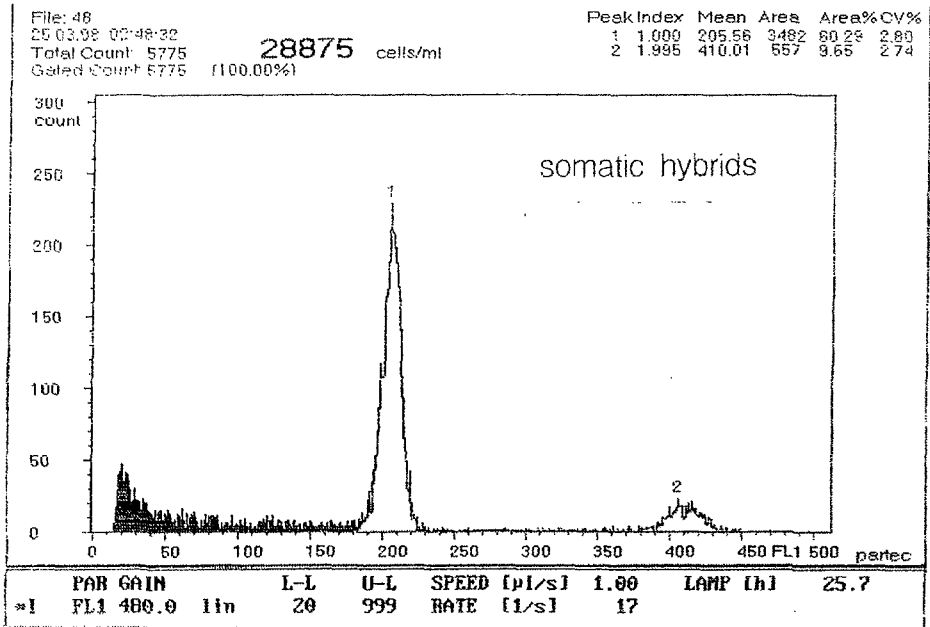
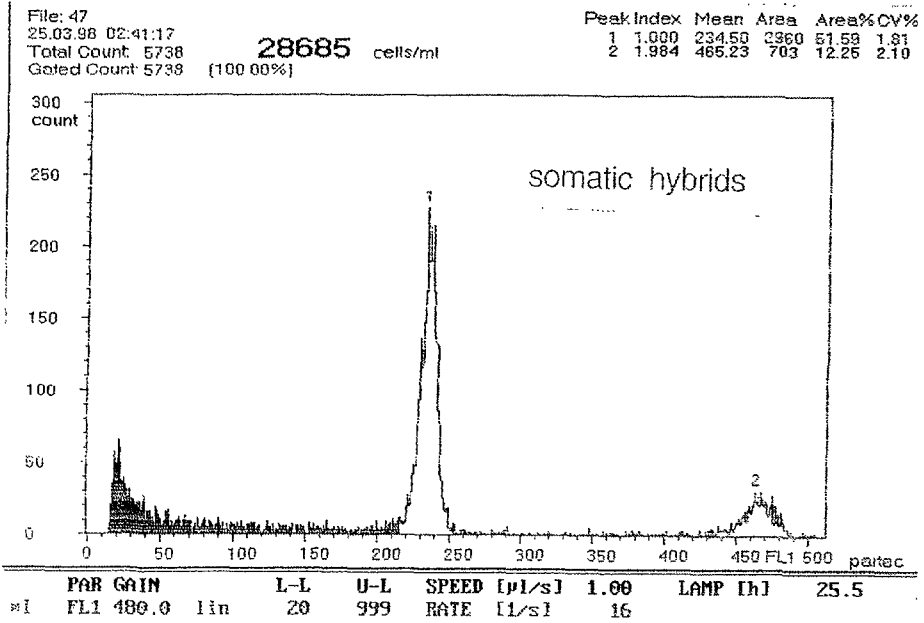


그림 12. Ploidy analyser를 사용한 체세포잡종식물체의 배수성 검정

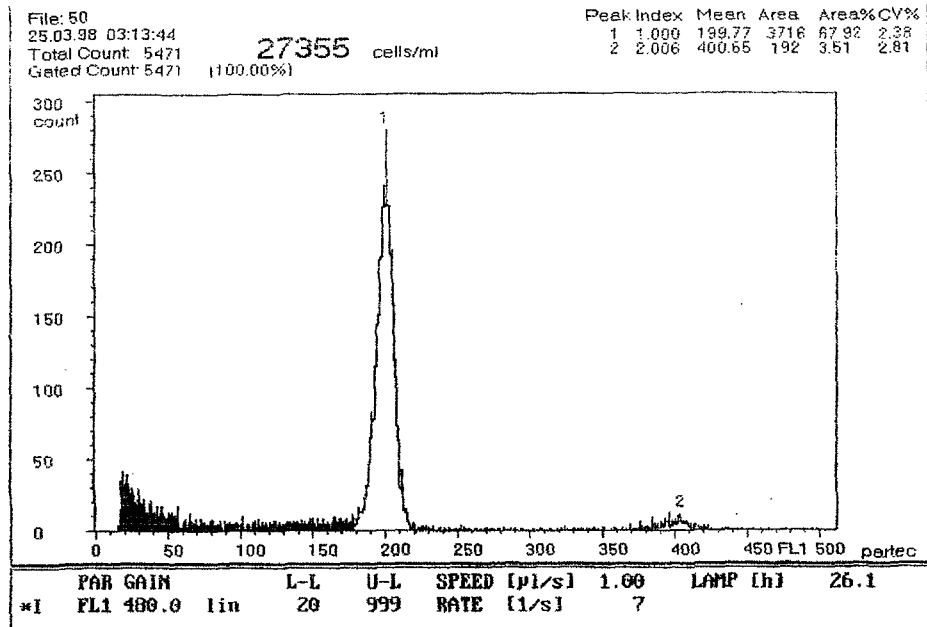
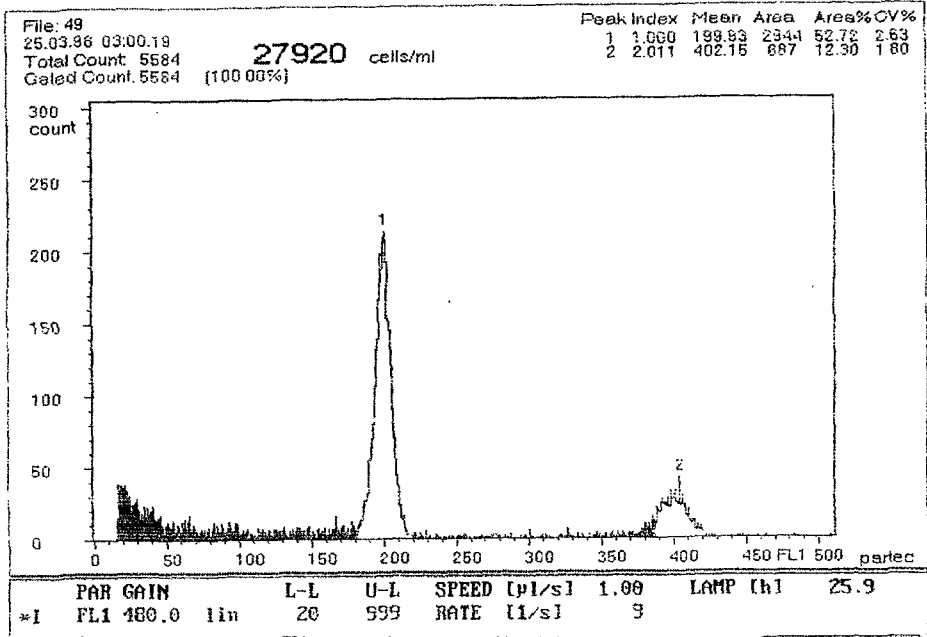


그림 12. Ploidy analyser를 사용한 체세포잡종식물체의 배수성 검정

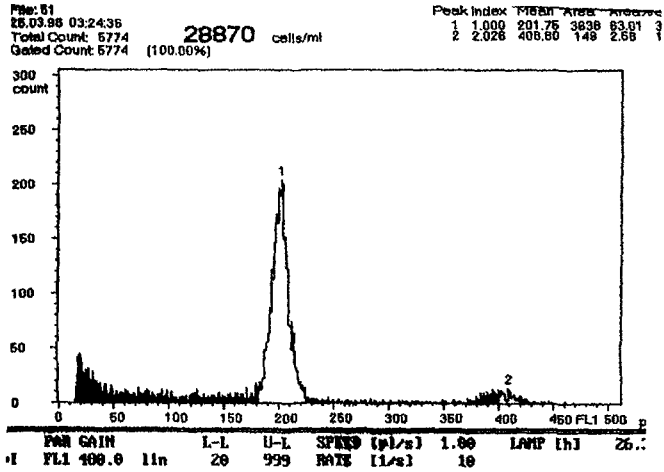


그림 12. Ploidy analyser를 사용한 체세포잡종식물체의 배수성 검정

5. 형태적 비교에 의한 융합여부의 검정

재분화된 식물체의 잎의 형태 그리고 엽맥의 형태, 그리고 꽃의 크기 꽃색을 비교하였다. 잎의 색깔은 브로콜리와 같은 색이었으나 브로콜리보다는 잎이 오그라지며 잎에 결각이 있었다. 엽병의 형태는 브로콜리와 비슷하였으나 엽맥이 희고 넓은 것은 배추와 비슷한 것 같았다.

배추나 브로콜리의 잎면이 주름져 있지는 않지만 세포융합체는 잎이 오그라진 형태였다. 재분화된 개체들간에는 큰 변이가 없었으며 외관상으로 비슷하였다. 이는 배수성 검정에서 개체들간의 변화폭이 없이 비슷한 것과 같은 결과를 보인다.

꽃의 크기는 일반 브로콜리나 배추보다 크고 색깔은 브로콜리가 좀 연한

황색을 띠는 것과는 달리 짙은 황색이었다. 엽맥은 대체로 브로콜리와 비슷하였으나 브로콜리보다 좀 넓고 굵게 나타났다. (그림 13)

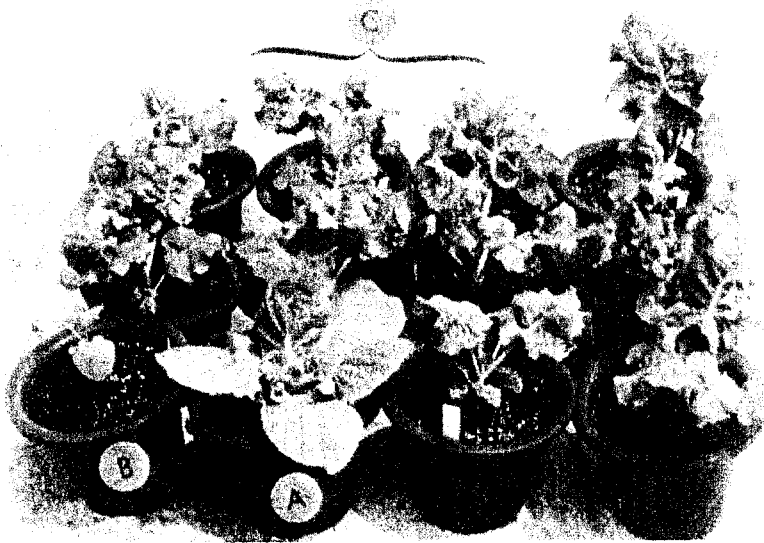


그림 13. 브로콜리와 배추의 세포융합에서 얻어진 식물체와 융합재료들의 형태적 비교

A: 배추 B: 브로콜리 C: 체세포잡종체

6. 추대, 개화 습성에 따른 융합체의 특성

융합체에 대한 저온감응성 연구나 보고가 없어서 저온처리에 대한 자료를 얻을 수 없으므로 순화과정을 거친 식물체를 키워가면서 영양생장 상태를 살펴 적절하다고 판단되는 시기에 저온처리를 실시하여야 하므로 pot에서 양육하였는데 배추와 브로콜리와 달리 저온처리실에서 30일간 저온 처리후 5일

간의 순화를 거쳐 상온에서 24시간 명조건의 인공조명으로 개화를 유도시켰다.

배추 x 브로컬리 융합식물체의 개화특성은 배추와 브로컬리의 중간적 특성을 나타내는 것으로 절간의 신장은 이루어지나 화아분화에는 브로컬리의 화아분화 요구온도보다 낮은 저온을 요구하는 것으로 판단된다.

배추 x 브로컬리 융합식물체의 개화시 화뢰는 브로컬리보다 커서 직경 0.4cm, 길이 0.6cm 정도로 화판의 색이 브로컬리보다 짙어 배추와 같은 짙은 황색이며 화판이 배추나 브로컬리보다 크고 화분생산량이 많았으나 교배임성은 매우 낮아 교배화당 종자수가 0.15립 이었으며, 종자의 크기도 3.1-0.7mm로 다양하였다.

배추와 브로컬리의 화분을 수정하였으나 임성을 나타내지 않아 배추의 화분을 수정한 조합에서는 종자를 전혀 얻을 수 없었으며 브로컬리의 화분을 수정한 조합에서 2.0mm 크기의 정상종자 2립 을 획득하였다. 획득한 후대 종자는 99년 8월28일 plug 육묘판에 파종하여 육묘 중에 있으며 현재 자엽과 하배축의 특성상으로는 배추보다는 브로컬리의 특성을 많이 따르는 것으로 판단된다.

이들 융합식물체의 후대들은 현재 생육상태가 배추나 브로컬리 보다 늦으므로 99년10월초에 정식 하여 원예적 형질에 따른 선발을 수행할 것이며 선발된 개체들은 겨울동안의 저온감응을 거쳐 형질고정, 임성 회복, 여 교배에 의한 유용형질 전이를 위한 과정을 수행하였다.(그림 14)

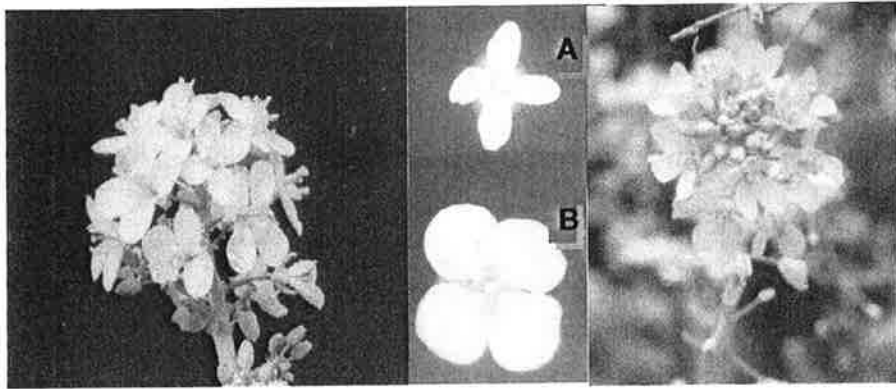


그림 14. 세포융합체 와 배추의 개화
 좌: 개화된 체세포잡종식물체 우: 융합재료인 배추
 A: 배추꽃 B: 융합체의 꽃

7. 화분발아력 실험에 의한 임성검정

체세포 잡종체는 융합과정에서 염색체의 결실과 같은 현상들이 발생하기에 임성이 낮다는 보고들이 있다. 세포융합체의 화기는 응예와 자예가 정상적이었으며 화분생산량이 많았다. 화분능력검정은 FDA염색방법으로 측정하였다. 구체적인 방법은 화분을 FDA 형광 염색시약으로 염색한후 UV현미경으로 관찰하였다. 현미경으로 관찰결과 화분들은 모두 높은 활력을 가지고 있는 것으로 나타났으나 교배 과정중에서 협당 종자수가 많지 않은 것으로 보아 임성이 낮은 것으로 판단되었다. (그림 15).

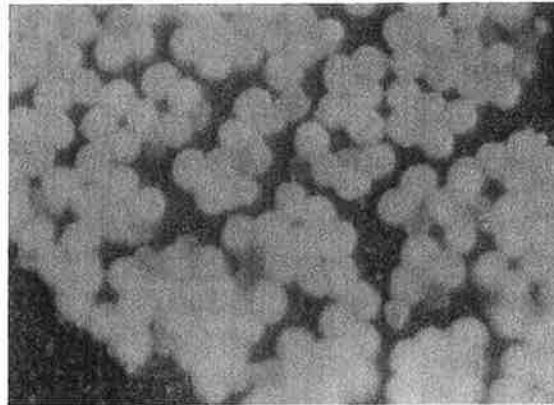


그림 15. FDA 형광염색방법에 의한 화분 활성화검정

8. 잡종 식물체 후대의 유지 및 증식

융합잡종식물체는 형태적으로 브로컬리에 가까운 특성이 강하였으나 엽형이나 화퇴형성은 브로컬리와 상당히 다른 형태를 보여 주었다. 특히 화퇴의 형태는 배추나 브로컬리와는 다른 새로운 형태적 특성을 보여 주었다. 개화습성 역시 배추와 브로컬리의 중간적 성질을 나타내어 상당히 낮은 온도의 저온에 감응한 후에 화아분화가 유도되는 것으로 생각된다.

개체간에는 형태적 변이가 적어 대부분의 개체가 형태적 유사성을 보였다. 그러나 개화한 꽃잎의 형태는 개체간에 차이를 보여서 배추꽃의 크기 보다 작은 것에서부터 브로컬리 꽃의 크기보다 큰 것까지 변이를 보였으며 브로컬리 꽃보다 크기가 크고 꽃잎의 형태는 배추꽃과 같고 화색이 짙은 꽃의 개체가 많았다.

잡종 당대의 식물체는 포트에 순화 후 저온 처리를 거쳐 20Klux 24시간 연속 조명 하에서 개화를 유도하여 후대종자를 획득하였으며, 이 때의 잡종

당대 임성이 매우 낮아 자가수분의 경우 협당 종자립수가 0.13 이었으며, 같은 세대의 융합식물체 사이의 타가수분 경우 0.18 이었다(그림 16)



그림 16. 개화된 배추와 브로컬리의 융합체 교배중
좌: 개화된 체세풍포융합체, 우: 교배중인 당대잡종체

잡종 후대에서도 형태적으로는 당대에서와 차이가 없었으며 개체간의 변이도 없었다. 꽃의 형태적 변이도 잡종 당대에서와 같은 경향이였다(그림 16). 교배 임성은 자가수분의 경우 당대에서와 차이가 없는 협당종자립수 0.12 이었으며 동일 세대 잡종식물체 사이의 타가 수분의 경우 0.24로 약간 높은 임성을 보였다. 이들 잡종 후대에 배추와 브로컬리 화분을 수분한 경우 임성은 각각 0.03-0.05, 배추 화분을 수분한 경우 임성은 0.02-0.06 수준이

었다.

잡종 2세대의 경우 개체에 따라 임성이 회복되는 경향을 보였는데 자가수분에서 협당립수가 1.02에서부터 0.23까지 개체간에 차이를 보였고, 같은 세대의 융합식물체 사이의 타가수분의 경우 1.35-0.98까지 차이를 나타내었다. 반면에 잡종 1대에 배추와 브로컬리를 교배하여 획득한 후대는 생육이 낮고 임성이 낮아 브로컬리 교잡 후대는 0.06, 배추 교잡 후대는 0.03 이었다.



그림 17. 배추와 브로컬리의 후대

9. 체중체계 확립

체세포잡종 식물체를 이용한 체중체계를 확립하는 데에는 이르지 못하였다. 잡종식물체의 임성은 개체에 따라 다소의 차이가 존재하였는데 임성이 높은 개체는 후대 개체들의 형태적 변이가 임성이 낮았던 개체들 보다 상대

적으로 적은 것으로 나타났다.

이는 융합잡종식물체에 융합에 사용한 편친을 여교잡한 후대에서도 임성이 높은 개체의 후대가 변이가 적은 것으로 나타나 융합잡종식물체가 세대를 거듭하면서 유전적 형태적으로 안정되어 감에 따라 임성이 회복되어지는 것으로 판단된다.

표 30. 융합잡종식물체 임성 검정

단 위: 협당립수)

조 합	세 대	자가수분	타가수분	여교잡	
				배추	브로컬리 양배추
배추×브로컬리	융합당대	0.13	0.18		
	융합1대	0.12	0.24	0.02-0.06	0.03-0.05
	융합2대	0.23-1.02	0.98-1.35		

제 3 절 *B. campestris*(CMS인 chinese cabbage)와 *B. oleracea*(CMS인 브로콜리)의 잡종식물체 생산

1. 재료 및 방법

증양종묘에서 분양받은 Ogura CMS 특성을 가지 배추kw23과 브로콜리kw56을 융합재료로 이용하여 실험을 수행하였다.

융합된 세포는 배양 3일만에 분열을 시작하였으며 배양 7일후에는 분열이 활발하게 일어났다. 활발하게 분열하는 세포들을 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 0. mg/l 2,4-D, 0.25mg/l BAP, 0.25mg/l Kinetin 이 첨가된 0.1% agarose 반고체배지에 옮겨주었고 다른 한 그룹은 액체배지에 그대로 두면서 신선한 배지만 교체해주면서 세포생장을 비교하였는데 반고체배지에 옮겨준 세포는 옮긴 후 12일이 지난 후부터 microcalli가 육안으로 보이는 정도로 빨리 성장하였다. 이와 반대로 액체배지에 신선한 배지를 보충해주면서 배양 하였던 세포들의 생장은 상대적으로 느렸다.

2. 식물체 재분화

Callus 들은 MS 배지에 2mg/l BAP, 2mg/l Zeatin, 0.5mg/lNAA, 가 첨가된 재분화배지에 치상하여 재분화를 유도시켰다. 원형질체 융합결과 12개의 식물체를 획득하였다.

KW23 과 KW56의 융합식물체는 외형이 배추에 가까우며 절간신장이 매우 적고 개화습성은 배추에 가까운 것으로 판단되어 본엽 10매 내외로 성장한 묘를 5℃ 항온조건에서 45일간 저온처리를 실시하였으며 저온처리 종료

후 20Klux 24시간 연속조명 조건에서 개화 유도하여 개화 추대 시켰다.(그림 18)

배추 × 브로컬리 잡종식물체는 배추와 브로컬리 양친 모두를 우성불임성 재료를 사용하여 융합한 잡종식물체로 우성불임 잡종식물체 획득의 기대를 가졌으며 잡종 당대의 형태적 특성이 1차 융합에서와는 달리 배추의 특성을 많이 나타내었으나 개화시에 화기 구조의 이상(암술 속에 여러겹의 암술 조직이 발달하여 임성을 가지지 못함-이러한 경우는 약배양으로 획득된 식물체에서 드물게 관찰된다)으로 후대를 얻지 못하였으나 우성기관 조직이 꽃잎으로 변화하여 우성불임이 확인되었다.



그림 18. 세포질 우성불임특성을 지닌 배추와 브로콜리사이의 체세포잡종식물체

제 7 장 세포융합방법을 이용한 *B. campestris* (Chinese cabbage)와 *B. oleracea*(Cabbage) 간의 체세포잡종식물체 생산 및 후대에서 검은뿌리 썩음병 (*Xanthomonas campestris* pv *campestris*)저항성 선발

제 1 절 서 설

양배추는 단백질, 당질, 무기질, 비타민 A, B1, B2, C 등이 많이 함유되어 있고 필수아미노산의 일종인 리진(lysine)이 있어 영양가치가 높다. 또한 비타민 중에는 항궤양성의 비타민 U를 함유하고 있으므로 생즙을 먹으면 위 궤양에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 양배추는 주로 생채로 이용이 많고 각종 요리에도 쓰여진다.

국내의 양배추 재배면적과 생산량이 매년 조금씩 증가하고 있지만 무, 배추에 비하면 재배면적이 적은 편이다. 1997년도의 재배면적은 4,572ha로서 채소 전체면적의 1.74%를 차지하고 있으며 생산량은 188,432M/T으로 10a당 수량은 4,121kg이다. 앞으로 식생활의 서구화 추세에 따라 점차 양배추의 재배가 증가될 것으로 전망된다.

이에 따라 채소의 품질개선은 필수적인 것이다. 식물육종의 주된 목적은 새로운 유전자형을 지닌 신품종을 만들어 내는 것이다. 가장 손쉬운 방법은 같은 종내에 존재하는 유전변이성을 찾아서 교배를 통해 유용한 형질을 원하

는 품종 또는 육종계통으로 옮기는 것이다.

따라서 육종에 이용될 다양한 육종소재를 만드는 것이 품종육종에 가장 중요한 단계라고 할 수 있다. 육종에 이용될 육종소재를 다양하게 만드는 것은 종간교배 또는 속간교배를 통한 새로운 유전자형을 창출하는 것이다. 뿐만 아니라 재배종에 결핍되어 있는 내충성, 내환경성 등의 유용한 형질들을 근연이나 원연간의 식물로부터 도입하기 위해 인공교잡에 의한 후대선발방법이 오랫동안 이루어져 왔다. 그러나 교잡에 의한 품종개량은 성적화합인 경우에 한해서만 가능하므로 이러한 문제점들을 해결하기 위해 기내배양을 통한 원형질체의 배양과 이들을 이용한 유전자 운반과 발현, 체세포잡종의 생성은 많은 기여를 하였으며 식물 분화 기작의 해명을 위한 연구에 있어서도 분자생물학적 접근을 가능하게 하였다.

십자화과 흑부병은 십자화과 채소작물에 큰 피해를 주는 병이다. 이 병은 *Xanthomonas campestris pv campestris*에 의하여 생기는 병인데 효율적인 방제대책이 없어 저항성이 높은 계통들을 육성하는 것이 아주 바람직하다. *B. oleracea*에서 세포융합을 통한 *Xanthomonas campestris pv campestris* 저항성 도입이라는 실험이 이루어진 바가 있다.

본 실험에서는 배추와 양배추간의 체세포잡종식물체를 생산하였으며 재분화된 식물체의 융합여부를 분자생물학적, 세포학적, 형태적인 방법으로 확인하였다. 뿐만 아니라 교배를 통한 체세포잡종식물체 후대특성검정과 임성, 후대의 특성들이 조사하였으며 체세포잡종체 제 2세대에서 흑부병 *Xanthomonas Campestris. pv. campestris*의 저항성 개체를 선발하였다.

제 2 절 원형질체 분리 및 배양

1. 재료 및 방법

중앙종묘(주)에서 분양받은 순계인 배추(kw23) 와 양배추(kw28)종자를 기내에 파종하여 실험재료로 사용하였다.

30%유한 락스로 표면살균한 종자들은 기내에서 발아, 성장시켰으며 본업을 사용할 시 MS 2%기본배지에 계대배양하여 3주지난 어린 식물체를 사용하였다. 세포 내의 전분함량을 줄이기 위하여 원형질체 분리전 24-48시간동안 4℃ 암상태에 보관하였다.

2. 원형질체 분리 용합 및 배양

원형질체는 1% Cellulysin 과 0.5% Macerozyme을 혼용하여 세포벽을 제거하였으며 Mannitol을 삼투조절제로 하였다

원형질체의 생산량을 높이기 위하여 식물체를 전처리 용액 TVL(54.6g/l mannitol, 7.4g/l CaCl₂.2H₂O, PH:5.6-5.8)에서 잘게 자른후 1-3시간 동안 방치하여두었다. 파스퇴르 파이펫으로 전처리 용액을 제거하고 효소용액을 8ml 정도 넣어서 약하게 교반하여 원형질체가 분리되게 하였다.

정제와 세척과정을 거친 원형질체는 w5용액으로 1×10^6 의 밀도로 조절하여 조심스럽게 섞은 후 6mm의 petri dish 에 7방울의 원형질체 현탁액을 떨구어 놓은 후 5분간 가라앉게 하였다. 그 위에 같은 volume의 40% PEG 용액을 조심스럽게 처리하였다. 10분이 지난 후 petri dish를 기울려 용액들을 따라내고 배양배지로 한번 세척하였다. 다음 1mm 의 배양배지를 넣어서 배지

가 증발하지 않도록 parafilm으로 잘 봉한 후 25℃ 암 상태에서 배양하였다.

배양 5일후 원형질체가 왕성하게 분열하기 시작하면 Kao 배지에 0.25mg/l 2,4-D, 0.025mg/l BAP, 0.025mg/l NAA, 1.0mg/l kinetin 이 첨가된 0.1% agarose에 옮겨 주어 희미한 약광 하에서 배양하였다. 캘러스가 2-3mm 정도의 크기일 때 3% MS 기본배지에 0.2mg/l Zeatin, 1mg/l BAP, 0.5mg/l kinetin, 0.4mg/l의 NAA가 첨가하여 식물체 재분화를 유도시켰다. 캘러스는 2주 한번씩 계대배양하였다. 세포배양 90일후 캘러스로부터 완전한 식물체가 재분화되었다.

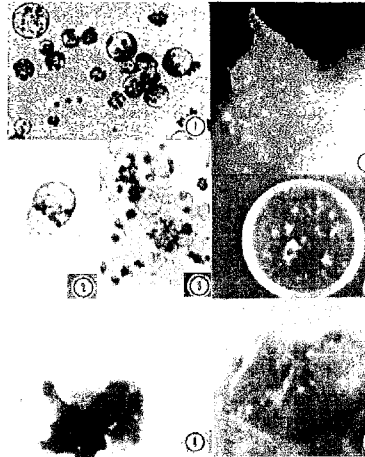


그림 20. 융합된 세포로부터 식물에 재분화 과정

- ①엽육세포로부터 분리된 원형질체
- ②융합된 원형질체
- ③분열하고 있는 원형질체
- ④20일후 융합된 세포에서 얻어진 캘러스
- ⑤재분화배지에 치상한 캘러스
- ⑥&⑦배양 90일후 원형질체에서 얻어진 캘러스에서 식물체가 재분화

제 3 절 Flow cytometry 분석 방법에 의한 체잡종식물체의 확인

배수성 검정을 위하여 식물체의 신선한 잎을 따서 4℃에 overnight 시켰다. 냉장고에 보관하였던 잎을 사방 0.5cm 크기의 로 잘라 HR -A 용액에서 잘게 chopping 하였다. 30 μ m의 고운 체로 거른 다음 sample tube에 담아서 실온에 방치하였다가 2ml의 Partec HR-B 용액을 첨가하여 ploidy analyser에 연결하였다. 20초 후에 DNA의 양을 측정하여 배수성을 확인하였다.

배수성검정결과 융합 partner 로 사용하였던 배추와 양배추는 비교적 안정한 배수성을 보아 2배체로 안정하게 나타났으며 융합체들의 DNA의 양으로 보아 얻어진 개체들이 융합체임을 확인할 수 있었으나 다양한 배수성을 보여주었다. 이는 재분화된 식물체가 비교적 불안정적이기 때문에 핵내 DNA의 양이 차이를 나타내고 있으며 또한 융합 시 두 개 이상의 세포가 융합될 수 있는 가능성이 존재하기 때문일 것이라고 생각된다(그림 21-22)

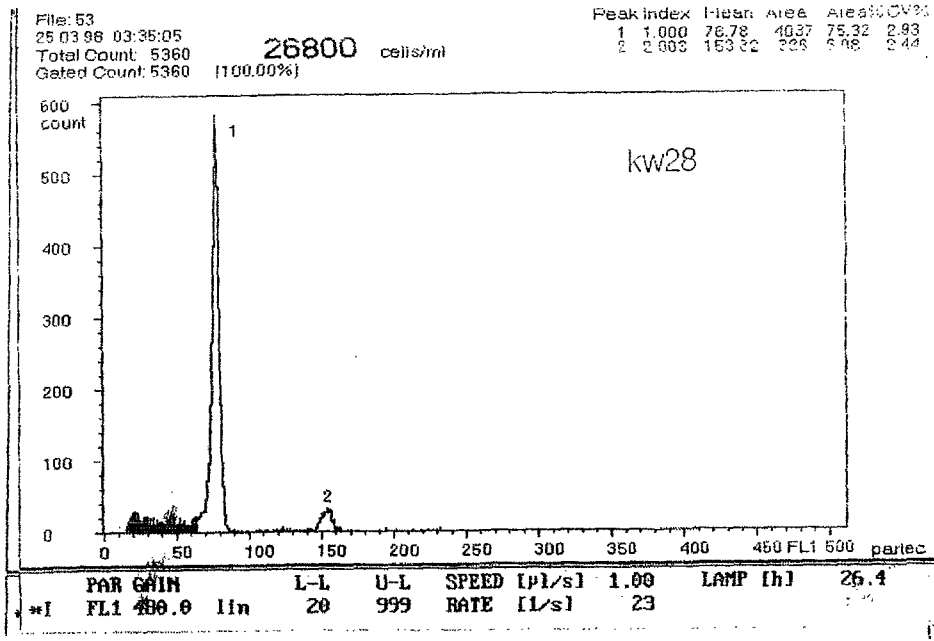
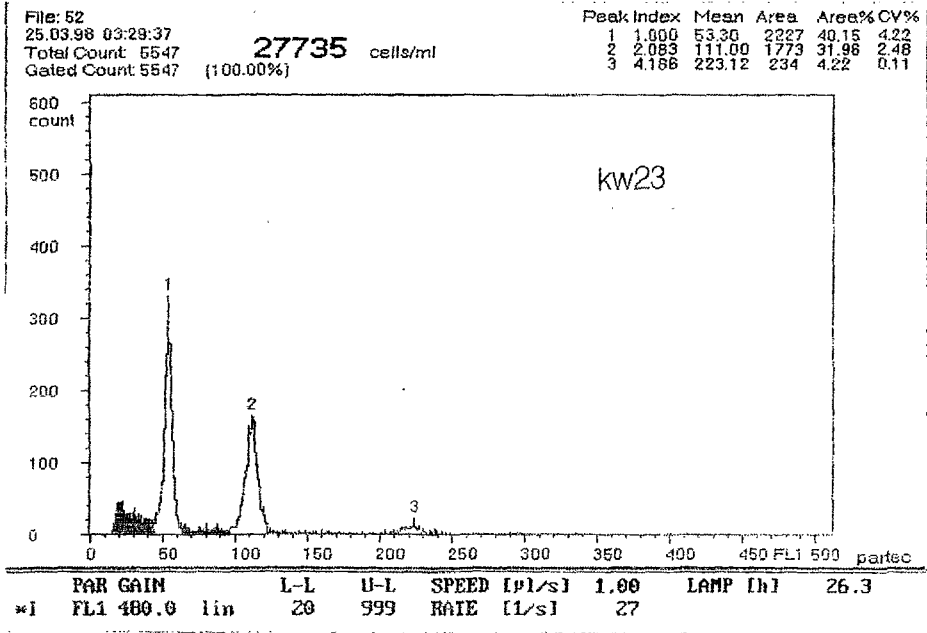


그림 21. 융합재료들인 배추(kw23)과 양배추(kw28)의 배수성검정

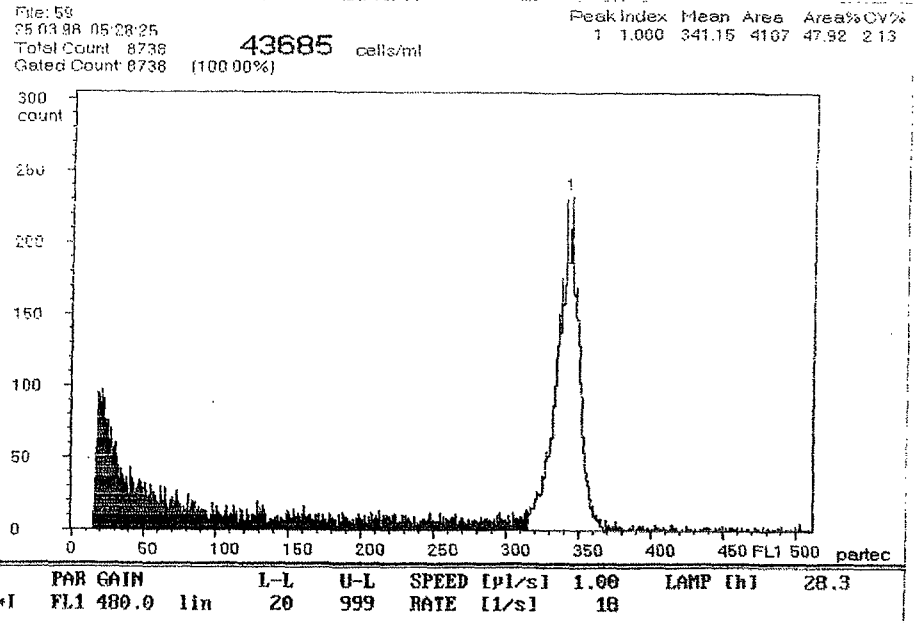
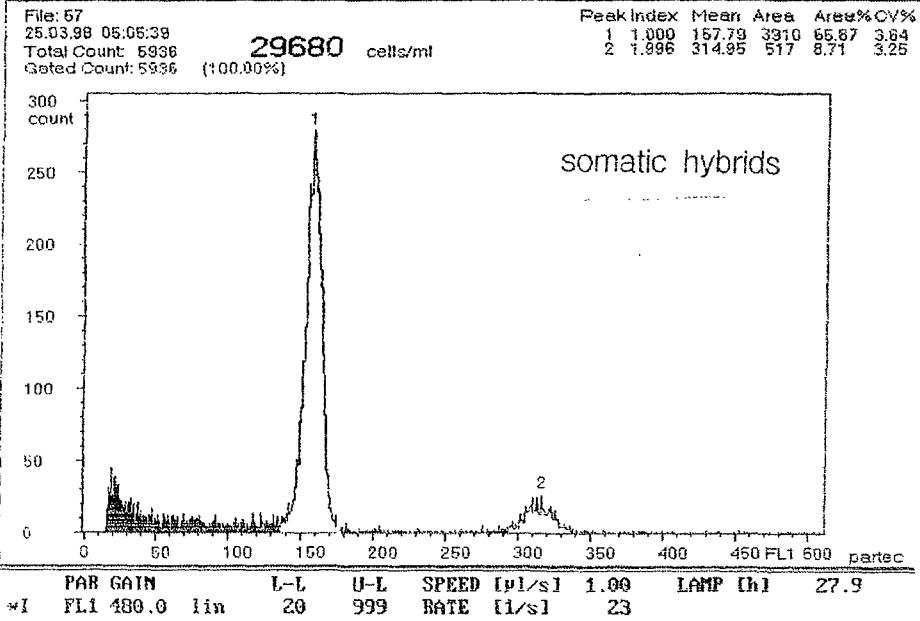
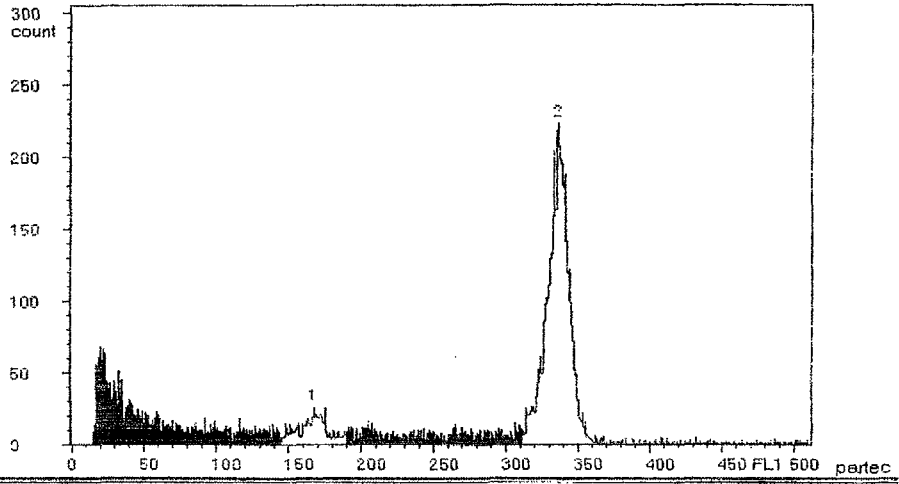


그림 22. 체세포잡종식물체의 배수성검정

File: 55
 25.03.98 04:41:24
 Total Count: 7918
 Colored Count: 7918 (100.00%)

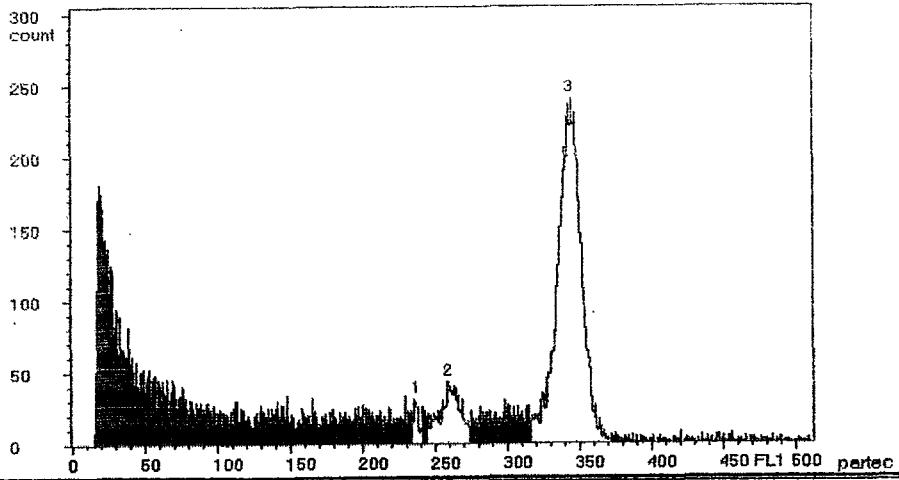
Peak Index	Mean	Area	Area%	CV%	
1	1.000	186.36	554	7.00	8.27
2	2.017	335.82	3992	29.17	1.50



PAR GAIN	L-L	U-L	SPEED [μl/s]	1.00	LAMP [h]	27.5
*I FL1 480.0 lin	20	999	RATE [1/s]	32		

File: 60
 25.03.98 05:41:40
 Total Count: 14259
 Colored Count: 14259 (100.00%)

Peak Index	Mean	Area	Area%	CV%	
1	1.000	236.58	148	1.04	0.74
2	1.267	250.67	150	6.23	2.70
3	1.450	373.00	4012	22.60	3.20



PAR GAIN	L-L	U-L	SPEED [μl/s]	1.00	LAMP [h]	28.5
*I FL1 480.0 lin	20	999	RATE [1/s]	28		

그림 22. 체세포잡종식물체의 배수성검정

제 4 절 염색체수 관찰 및 *genomis in situ* hybridization 방법 에 의한 융합여부의 확인

1. 염색체수 관찰

재분화된 식물체는 염색체수 관찰 방법과 Genomic in situ hybridization 방법으로 확인하였다.

염색체는 재분화된 식물체의 root tip을 채취하여 8-hydroxyquinoline으로 한시간 처리한 다음 3:1 EtOH 와 acetic acid로 고정시켰다. 고정시킨 뿌리는 slide glass위에 놓고 아세트 카민으로 염색시킨 다음 염색된 root tip은 squash 방법으로 현미경하에서 염색체수를 관찰하였다.

배추는 $2n=20$ 이며 양배추는 $2n=18$ 인에 비하여 염색체는 33-38 심지어는 76개의 염색체수를 관찰 할 수 있었다. 관찰된 염색체수로부터 얻어진 식물체들이 체세포잡종체임을 확인할 수 있었다.

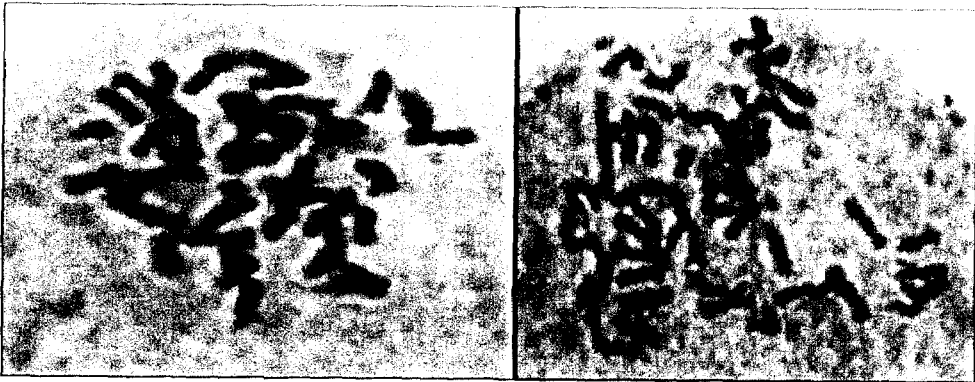


그림 23. 배추와 양배추사이의 체세포잡종식물체 염색체수 $2n=38$ 인

2. Genomic in situ hybridization

종간 혹은 종간 잡종식물은 종간 혹은 종내의 염색체의 이전(移轉)은 궁극적으로 새로운 품종을 육성하려는 목적으로 되어 생산되었기에 잡종식물의 염색체상의 분석은 아주 중요하다. 뿐만 아니라 잡종식물체는 감수분열시기 염색체의 분석에 널리 이용되기도 한다. 유사분열중기에는 일부 잡종식물체의 염색체상에서 모본과 부분의 염색체를 구분할 수 있다. Genomic in situ hybridization (GISH)방법은 염색체를 in situ에서 Southern 이전(移轉: transfer)하여 잡종식물체임을 확인할 수 있으며 잡종식물체상의 개개의 염색체를 확인할 수 있다. 배추와 브러컬리와외의 원형질체 융합으로 얻어진 잡종식물체의 염색체를 in situ hybridization 시켰을 때 양쪽의 서로 다른 염색체 색깔로 정확하게 한쪽의 염색체 몇 개가 도입되었는지 알 수 있다.

가. 염색체 slide 준비

염색체 관찰을 위하여 전처리 과정을 거쳤던 root tip들을 slide는 효소처리방법 혹은 squash 방법을 이용하여 준비하였다. 준비된 slide는 상온에서 적어도 3일동안 말린 상태에서야 hybridization 실험을 진행할 수 있다.

나. probe labelling

Probe는 Nick translation 방법으로 labelling 하였는데 Total 6 μ g의 DNA를 8 μ l의 5X Biotin-dNTP mix와 8 μ l 5X Nick translation 용액을 첨가하여 40 μ l volume이 되게 하여 15 $^{\circ}$ C에 두 시간 동안 놓아두었다. 다음 2 μ l의 0.5M EDTA(PH:8.0)을 넣어서 65 $^{\circ}$ C에 10분간 두었다.

다. RNase 처리

Slide 당 100 μ g/ml의 RNase용액을200 μ l씩 떨구어 놓은 다음 37 $^{\circ}$ C에서 1h 시간 처리하였다. RNase 처리후 2XSSC로 5 분간washing 하고 이어서 70%, 95% 99.9%의 EtOH에서 각 5분간 탈수 시킨 후 자연 건조시켰다.

라. slide 와 probe의 변성

35ml formamide, 5ml 20XSSC, 을 각각 넣은 후 최종 volume을 50ml로 만들어 72 $^{\circ}$ C되게 하여 slide를 2분 30초간 담그며 다음차례로 70%, 95% 99.9%의 EtOH에서 탈수시켰다. Probe는 잘 섞은 후 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리한 후 얼음에 박았다가 원심분리하여 사용하였다.

마. hybridization

- (1) 70 μ l/slide의 probe를 떨어뜨리고 plastic coverslip(onco)을 덮는다.
- (2) 37 $^{\circ}$ C에서 overnight
- (3) 위의 slide의 물기를 paper상에서 제거.
- (4) 40 $^{\circ}$ C에서 washing

2 \times SSC	10min
50%formamide /2 \times SSC(3번 사용후 교체)	10min
2 \times SSC	10min
4 \times SSC	10min
- (5) slide가 건조되지 않도록 주의!

바. Immunological detection

<Blocking>

(1) 5% BSA/BT buffer를 600 μ l 취해 slide가 마르기 전에 충분히 퍼뜨리고 이것을 humid chamber에 5min, 37 $^{\circ}$ C 간 넣어둔다.

<Detection>

(2) FITC-avidin/1%BSA, 4 \times SSC mixture

(FITC)-avidin conjugate(잘 가라앉으므로 tapping) : 3 μ l 1
1%BSA, 4 \times SSC (6ng/600 μ l) ; 300 μ l 100

위의 혼합액을 paper위에 놓인 한 slide에 70 μ l씩 모퉁이에 떨어뜨린 후 parafilm으로 잘 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation in incubator.

<Washing>

(3) Cover 제거 후 물기 제거한 다음

1 \times BT buffer(40 $^{\circ}$ C) 10min 1'

1 \times BT buffer(40 $^{\circ}$ C) 10min 2'

1 \times BT buffer(40 $^{\circ}$ C) 10min 3'(이때 ④번 준비!)

<Blocking>

(4) 5% goat serum/BT(150 μ l/3 μ l)를 15ml falcon tube에 만들어 놓는다.

(5) 위의 용액을 600 μ l를 떨어뜨리고 5min 간 37 $^{\circ}$ C에 놓아둔다.

<Detection>

(6) Biotynilated anti-avidin + goat serum/BT(3 μ l/297 μ l)을 70 μ l씩 떨어뜨린다.

(7) parafilm으로 덮고 37 $^{\circ}$ C에서 hr.

<Washing>

(8) Cover 제거 후 물기 제거한 다음

1 \times BT buffer(40 $^{\circ}$ C) 10min 1'

1 \times BT buffer(40 $^{\circ}$ C) 10min 2'

1 \times BT buffer(40 $^{\circ}$ C) 10min 3'

(9) slide상의 물기 제거

<Blocking>

(10) 5% BSA/BT의 600 μ l을 취하여 37 $^{\circ}$ C에서 5min.

<Detection>

(11) Extra-avidin-FITC + 1%BSA/4 \times SSC(3 μ l/297 μ l)의 용액을 70 μ l떨어뜨린 후 parafilm으로 덮고 37 $^{\circ}$ C에서 1hr incubation.

<Washing>

(11) 1 \times BT buffer 10min

1 \times BT buffer 10min

2 \times SSC buffer 10min (각각, 2 \times SSC buffer 5min씩)

<Counterstaining및 관찰>

(12) Hoil box로 slide를 덮고, buffer에 담긴 채 하나씩 꺼내면서 다음 과정을 수행한다.(물에 살짝 washing한 후 물기 제거 후 진행!)

10% PI/ 90%glycerol 15 μ l

vecter shield 15 μ l

위의 성분을 1: 1 비율로 넣고 cover glass(알콜에 담갔다 사용, 24 \times 32mm)로 덮고(이 때 기포가 생기지 않도록 주의) 물기를 paper로 감싸 제거한 후 메니큐어로 봉입한다.

***PI solution(조금밖에 사용 안하므로 2.5ml정도만 만들어서 사용)**

PI (10ng/ml) 2.5 μ l

DABCO 0.5 μ l

PBS(-) 0.5 μ l

Glycerol 4 μ l

Total 5 ml

(13) 위의 것을 검은 상자에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 보관한다.

(14) G excitation filter를 이용해 관찰

DAPI시엔 도시락에서 10분(room temp.) 방치후 washing 2번한다.

사. Counterstaining 및 관찰

실험결과 배추와 양배추를 융합하여 probe를 배우의 genomic DNA를 사용하였을 때와 배추와 양배추의 Genomic DNA probe로 사용하였을 때 나타나는 양상을 다소 차이점들이 있었다. 그림에서 보는 것처럼 황색을 띠는 것을 배추 Genomic DNA를 probe로 사용하였을 때 나타나는 양상이다(그림 24). 실험 결과에서 보는 것처럼 일부 체세포잡종식물은 배추의 염색체 양상을 많이 나타낸 것으로 나타났다.

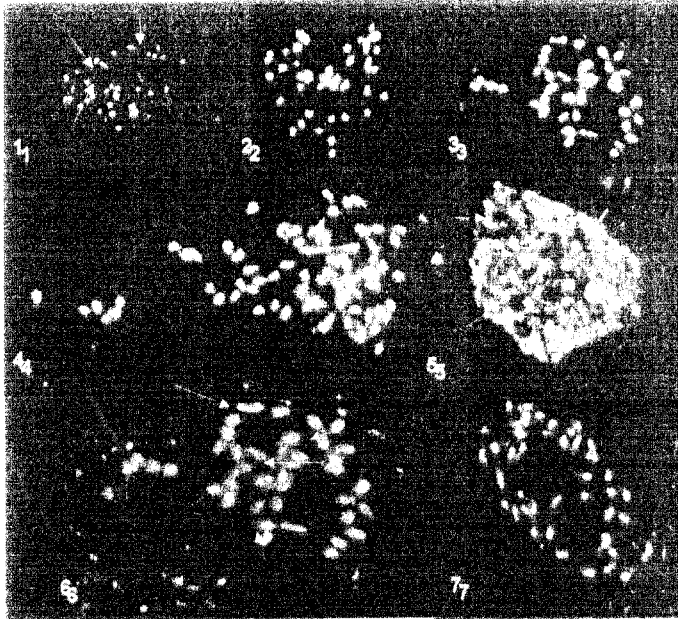


그림 24. Genomis in situhybridization 의한 잡종식물체의 염색체 양상
chinese cabbage X cabbage.Red color marks the chinese cabbage
chromosome segments and green color marks the cabbage chromosome
segments(5, 7)

제 5 절 체세포잡종식물체의 형태적 비교

융합잡종식물체는 형태적으로 매우 다양하게 발현하였다. 엽형이 배추에 가까운 특성을 지닌 것에서부터 완전한 양배추에 가까운 것까지 매우 다양하였다. 대부분 잡종식물체들은 외관상으로는 양배추와 비슷하였다(그림 25).



그림 25. 융합모본과 체세포잡종체의 형태적인 차이

A, B: 융합재료로 이용된 배추(*B. campestris*)와

양배추(*B. oleracea*), C: 체세포잡종식물체

잎의 형태도 다양한 변이를 보여주었다. 배추의 엽병은 넓고 양배추는 좁은 엽병을 가지고 있으나 잡종식물체는 중간형을 가지고 있었으며 엽맥은 배추와 아주 비슷한 반면 엽색은 양배추와 비슷하였다.

잎의 형태 뿐 아니라 모용도 변이가 다양하여 배추와 같이 모용이 많은 것에서부터 양배추와 같이 모용이 없는 것까지 밀도에 있어서 다양한 변화를 보였으며 엽면의 납질 또한 다양한 변화를 보였다. 외형적으로 양배추에 가까운 잡종의 경우도 엽연의 거치나 결각 등에서 융합에 사용한 재료와는 다른 특성을 나타내었다. 잡종식물체의 다양한 변이는 세포들이 융합되면서 핵

내 염색체의 재조합과 세포질내의 염색체의 재조합때문에 재분화된 식물체도 아주 다양한 것으로 생각한다. 그림 23에서 보는 것처럼 융합체들 사이에도 차이가 많았다(그림 26).

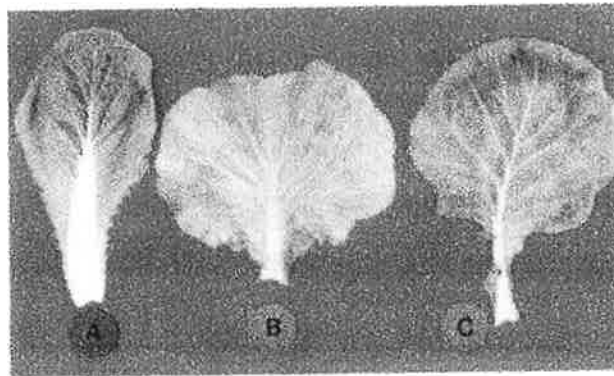


그림 26. 체세포잡종체와 융합모본들의 잎의 형태적인 비교
A, C: 융합재료로 이용된 배추(*B. campestris*)와 양배추(*B. oleracea*), B: 체세포잡종식물체

제 6 절 개화. 추대습성 비교

개화습성은 대부분의 잡종 식물체가 양배추와 같은 green-vernalization 습성을 나타내었다. 개화한 꽃잎의 형태는 개체간에 많은 차이를 보여서 배추꽃의 크기 보다 작은 것에서부터 양배추꽃의 크기보다 큰 것까지 변이를 보였으며 양배추 꽃보다 크기가 크고 꽃잎의 형태는 배추꽃과 같고 화색이 짙은 꽃의 개체가 많아 배추 × 브로컬리 잡종에서와 같은 양상을 보였다.

잡종 당대의 식물체는 포트에 순화 후 본엽 14매 내외 줄기직경 1cm 내외로 신장시킨 후 5℃ 항온 조건에서 45일간 저온 처리를 실시하였으며 20Klux 24시간 연속 조명 조건에서 개화를 유도하여 후대를 유지하였다. 이 과정에서 저온 처리시에 묘의 크기가 상대적으로 컸던 식물체는 조기에 개화가 유도되었으며 묘의 크기가 작았던 식물체는 정상적으로 개화가 진행되지 못하였다.

잡종 당대의 임성은 자가수분의 경우 협당립수가 0.11에서 0.06까지 개체 간에 다소의 차이가 있었으나 대체로 매우 낮았으며, 같은 세대의 융합식물체 사이의 타가수분의 경우 0.23-0.76으로 자가수분의 경우보다 다소 높아 배추 × 브로컬리 융합잡종에서와 같은 경향을 보였다. 잡종 식물체에 배추를 여교배한 경우는 협당립수가 0.02-0.04로 극히 낮았으며 종자의 크기도 보통의 양배추 종자 보다 큰 것에서부터 매우 작은 것까지 다양하였다.



그림 27. 배추와 양배추와 체세포잡종체의 개화
A, C: 융합재료로 이용된 배추(*B. campestris*)와 양배추(*B. oleracea*); B: 체세포잡종식물체

제 7 절 체세포잡종식물체의 교배후대1세대 의 특성

체세포잡종식물체를 교배하여 획득된 후대에서는 잡종식물체 자가 수분 후대의 경우 형태 변이가 계속되어 동일 개체에서 유래한 후대 개체간에 다양한 변이를 보였으며, 배추를 교배한 후대의 경우도 다양한 개체 변이를 나타내었는데 이 경우 전체적으로 배추로부터 유래되는 형질이 많이 발현하는 것으로 나타났다(그림 28). 그 대표적 형질로 모용의 경우는 동일 잡종 식물체로부터 자식 종자와 배추교잡 종자를 획득하여 조사한 후대에서 자식 후대 식물체는 모용이 없었으나 배추를 교잡한 후대 식물체는 모용이 많이 발생한 경우가 있었다.



그림 28. 포트에 파종하여 재배하고 있는 체세포잡종체후대
(유묘기의 형태는 배추와 비슷하나 엽형은 양배추와 비슷함을 알 수 있다)

잡종 식물체 후대의 임성은 잡종 1대에서 자가 수분의 경우 0.35에서 0.09 까지 조사되었으며, 같은 세대의 융합식물체 사이의 타가수분의 경우 0.42-0.16이었다. 배추를 교잡한 후대에서 0.12에서 0.04까지의 차이를 보이는 것으로 조사되었다. 획득된 종자의 형태나 크기에서도 잡종 당대에서도 같은 다양한 변이가 관찰되었는데 이것은 잡종식물체 내에서 염색체 상의 변화가 진행중인 것으로 보여진다.

잡종 당대 식물체에서 획득한 배추를 교잡한 종자의 크기가 매우 작은 것에서부터 매우 작은 것까지 발아와 이후의 생육이 정상적으로 이루어지고 임성도 특이한 변이를 보이지 않았으며 크기가 가장 작았던 종자에서 유래된 후대 종자의 크기는 정상으로 회복된 것에서부터 전세대의 종자 크기와 유사한 정도의 작은 종자까지 결실하여 이들로부터 각기 다양한 특성을 지닌 재료가 육성될 수 있을 것으로 기대되었다.(표 31)

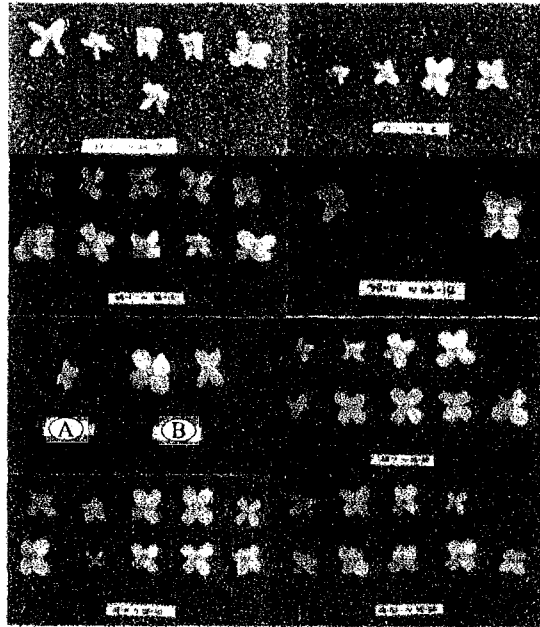


그림 29. 배추와 양배추의 체세포잡종체의 교배1세대의
꽃의 크기와 모양의 변화

22-1~22-7:progenies of Open- pollination of somatic hybrids1

23-1~23-4:Progenies of somatic hybrids bacrossed with *B.campestris*

24-1~24-14: progenies of selfing of somatic hybrid1

25-1~25-30:progenies of Open- pollination of somatic hybrid2

A:*B.campestris*; B:Somatic hybrids of 1, 2

표 31. 체세포잡종식물체의 교배후대의 특성

No	Stem color	shape of leaves	Flower size
21-1	W	E	B
21-2	W	N	M
21-3	P	I	M
21-4	P	I	M
21-5	P	N	S
22-1	P	I	S
22-2	P	E	M
22-3	P	N	M
22-4	P	N	M
22-5	W	I	M
22-6	W	N	M
22-7	W	E	M
23-1	P	E	S
23-2	P	I	B
23-3	P	I	M
23-4	P	N	S

P: purple

W: white

E: Enlarged

N: Narriow

I: Intermediate

B: Big

S: Small

M: Meddle

표 31. 체세포잡종식물체의 교배후대의 특성(계속)

No	Stem color	shape of leaves	Flower size
24-1	W	N	B
24-2	W	I	M
24-3	P	I	B
24-4	P	N	B
24-5	W	E	B
24-6	W	E	B
24-7	W	I	B
24-8	W	I	M
24-9	P	E	M
24-10	P	N	B
24-11	W	I	M
24-12	P	N	-
24-13	W	N	-
24-14	W	N	M

P: purple

W: white

E: Enlarged

N: Narrow

I: Intermediate

B: Big

S: Small

M: Middle

표 31. 체세포잡종식물체의 교배후대의 특성(계속)

No	Stem color	shape of leaves	Flower size
25-1	W	I	M
25-2	P	N	M
25-3	P	N	B
25-4	P	N	B
25-5	P	N	-
25-6	P	N	S
25-7	P	N	B
25-8	P	N	B
25-9	P	N	B
25-10	P	I	B
25-11	P	E	M
25-12	P	N	M
25-13	P	N	B
25-14	P	N	B
25-15	W	N	S

P: purple

W: white

E: Enlarged

N: Narlow

I: Intermediate

B: Big

S: Small

M: Meddle

표 31. 체세포잡종식물체의 교배후대의 특성(계속)

No	Stem color	shape of leaves	Flower size
25-16	P	N	B
25-17	P	I	S
25-18	P	N	M
25-19	P	N	M
25-20	P	E	M
25-21	P	N	B
25-22	P	I	M
25-23	W	I	M
25-24	W	E	S
25-25	P	N	-
25-26	P	N	M
25-27	P	N	B
25-28	W	N	M
25-29	W	I	B
29-30	W	E	B

No	Stem color	shape of leaves	Flower size
26-1	P	E	M

P: purple

KBS1

W: white

Line 21: selfing

E: Enlarged

Line 22: openpollination

N: Narrow

line 23: Backcross with one of fusion partner

I: Intermediate

KBS2

B: Big

Line 24: selfing

S: Small

Line 25: openpollination

M: Meddle

Line 26: Backcross with one of fusion partner

제 8 절 체세포잡종식물체의 교배2세대의 특성

잡종식물체로부터 획득된 잡종2대 종자를 파종하여 형태적 특성을 비교한 결과 전세대에 양배추에 가까운 외형적 특성을 나타내었던 개체로부터 유래한 후대는 개체간에 변이가 적고 전 세대와 유사한 특성을 나타내었으며, 배추의 특성을 많이 나타내었던 전세대 개체에서 유래한 후대는 개체간에 다양한 변이를 나타내었으나 전체적으로 배추의 특성이 많이 유지되고 있었다. 또한 배추를 여교배한 후대의 경우도 배추와 유사한 엽형을 나타내었으나 엽면의 납질이 많고 엽육이 두터우며, 생육이 늦은 등의 양배추로부터 유래한 것으로 판단되는 형질도 함께 발현하였다 (그림 30).

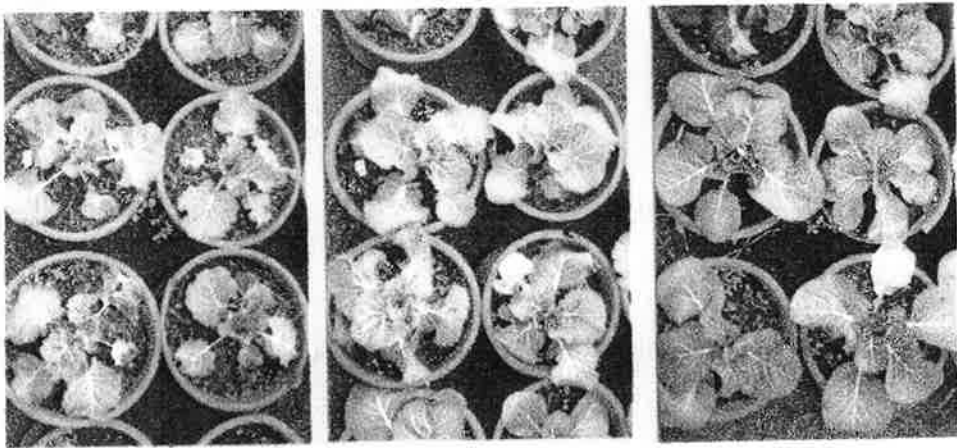


그림 30. 체세포잡종식물체의 제2세대의 다양한 형태

잡종식물체의 2세대의 엽형태도 아주 다양한 분리를 보여주었다. 같은 그룹내에서 다르게 나타났다. X4 line에서는 엽형이 거의 양배추에 가까웠으나 잎에 모용이 약간 있는 것으로 보아 배추의 형질을 가지고 있으며 X6line 들은 X4 line보다 좀 더 뚜렷하게 배추의 형태를 나타내지만 엽색은 양배추 색이었다. 이들 중에서 가장 배추에 가까웠던 것은 Xp line 인데 잎에 난 모용이나 엽 원의 형태로 보아 배추와 아주 가까운 것으로 나타났다. (그림 31). 그러나 모든 line의 잎에는 결각이 나있는 공통점이 있었다.

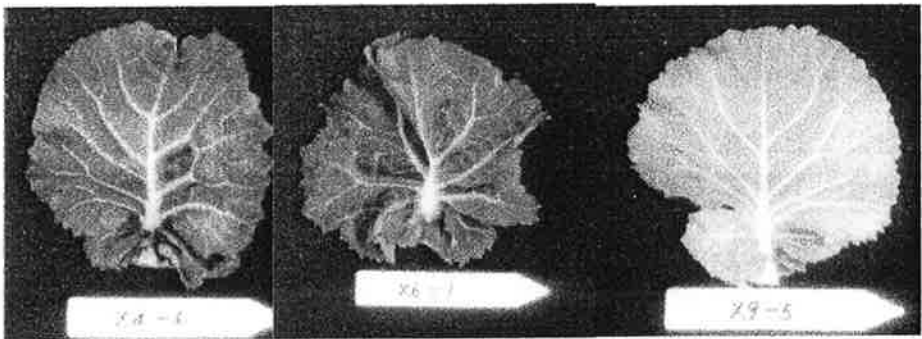


그림 31. 체세포잡종식물체의 다양한 잎의 형태

제 9 절 잡종식물체의 흑부병 저항성 검정

잡종식물체로부터 획득된 잡종2대 종자를 파종하여 흑부병 저항성 검정을 수행하였다. 흑부병 저항성 검정 접종 조건에서 자연 상태에서는 좀처럼 보기 어려운 배추에서의 흑부병 병징이 발현하였으며 잡종식물체 후대는 전체적으로 배추나 양배추와 유사한 정도의 이병성을 나타내었으며, 개체간에 차이가 있었다. 이에 따라 내병성을 보인 개체를 선발하였다. 선발된 개체는

후대를 유지하여 내병성 확인 시험을 거쳐야 할 것으로 생각된다(그림 32).

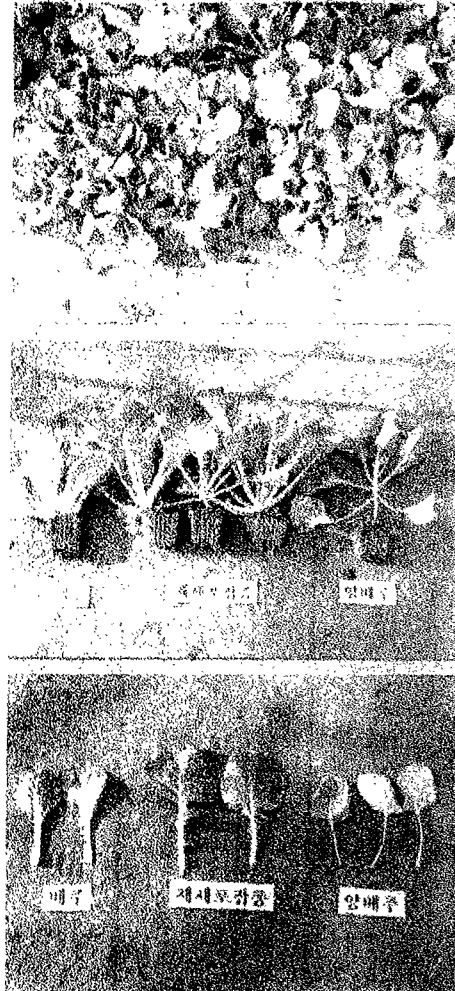


그림 32. 흑부병저항성 검정을 거친 잡종식물체후대의 이병성 내병성의 차이

제 10 절 채종체계 확립

체세포잡종 식물체를 이용한 채종체계를 확립하는 데에는 이르지 못하였다. 잡종식물체의 임성은 개체에 따라 다소의 차이가 존재하였는데 임성이 높은 개체는 후대 개체들의 형태적 변이가 임성이 낮았던 개체들보다 상대적으로 적은 것으로 나타났다.

이는 융합잡종식물체에 융합에 사용한 편친을 여교잡한 후대에서도 임성이 높은 개체의 후대가 변이가 적은 것으로 나타나 융합잡종식물체가 세대를 거듭하면서 유전적 형태적으로 안정되어 감에 따라 임성이 회복되어지는 것으로 판단된다.

표 32. 융합잡종식물체 임성 검정

단 위: 협당립수)

조 합	세 대	자가수분	타가수분	여교잡	
				배추	브로컬리 양배추
배추×양배추	융합당대	0.11	0.23-0.76	0.02-0.04	
	융합1대	0.09-0.35	0.16-0.42		

제 8 장 세포융합방법을 이용한 세포질웅성 불임 특성을 갖으로의 도입

제 1 절 서 설

십자화과 작물은 기름, 조미료, 가축의 먹이, 식량 생산에 사용되고 있는 중요한 채소 작물 중의 하나이다(Prakash 등, 1998). 십자화과 채소에는 배추, 컬리플라워, 브로콜리, 양배추, 갓 등이 있다. 그 중 갓은 배추, 무와 함께 우리나라의 중요한 엽채류 중 하나로 일반적으로 단백질, 무기물인 칼슘, 철, 당질인 포도당, 자당, 비타민 A, B, C등의 함량이 다른 채소에 비해 높고, 소금 절임을 해도 생것 못지 않게 식품가치가 높으므로 김치재료로 이용해도 영양 적 가치가 높아 아시아 거의 전역에서 재배되고 있다. 최근에 국내에서도 갓 김치의 수요가 높아지고 있는 실정이고, 특히 인도를 비롯한 동남아 국가에서 갓은 한국의 배추 같이 가장 중요한 채소 작물이다.

갓의 이러한 중요성에도 불구하고 현재 국내에서 재배되고 있는 갓 품종의 채종 체계가 확립되어 있지 않아 일본산 종자를 도입 활용하고 있으나 종자 가격 부담 과중과 적기 구입이 곤란하며, 계속되는 자가 채종으로 인한 종자의 퇴화와 품질저하로 많은 경제적 손실을 가져오고 있다. 다른 십자화과 채소, 특히 배추의 경우 양질의 F1 잡종 종자를 채종하기 위해서는 지금 까지 자가 불화합 특성을 이용해 왔다. 그러나 자가 불화합성이 다소 강한 배추와 무라 하더라도 자가 불화합성을 이용하여 순도가 100%에 이르는 종자를 얻기는 불가능한 일이다. 이러한 단점을 보완하기 위해서 현재 세포질 웅성 불임 특성(CMS)을 이용한 종자 채종이 십자화과 채소에서 널리 적용되어

오고 있다.

세포질 융성 불임 특성을 이용한 종자 채종에 있어서의 이점은 꽃가루를 제거하는 제웅 작업의 생략으로 노동력과 경비를 절감할 수 있고 100% 1대 잡종 종자를 얻을 수 있어 종자 순도 검정에 들어가는 막대한 비용을 줄일 수 있고, 이에 따른 종묘 분쟁의 소지가 거의 없어질 수 있다는 것이다. 이러한 세포질 융성 불임성의 중요성이 인정되지만 세포질 융성 불임성을 일으키는 유전자가 세포질인 마이토콘드리아 내에 존재하고 모계유전을 하기 때문에(Bonhomme 등 1991) 교잡 육종법으로 세포질 융성 불임성이 아닌 식물체로 도입해서 세포질과 핵을 치환하는데 오랜 시일이 걸린다. 또한 마이토콘드리아 지놈과 같이 이동하는 엽록체 지놈의 영향이 유전적인 불안정과 저온에서의 황엽 현상으로 채종을 어렵게 해서 사용이 어렵다.

이러한 문제를 해결하기 위해서 세포융합(원형질체) 기술이 효율적으로 적용될 수 있다. 이미 유채의 경우 세포융합 기술을 이용해서 세포질 융성 불임성 품종을 만들었고(Peltier 등 1983), 양배추의 경우도 이렇게 만들 잡종종자가 외국회사에 의해서 시판되고 있는 실정이다. 세포융합 기술은 일반적인 조직배양 기술과는 달리 오랜 시간의 경험이 필요하며 각 작물에 맞는 조건을 만드는데 많은 시간이 걸린다는 점에서 국내외적으로 하는 사람이 매우 한정되어 있다. 외국의 경우는 주요 종묘회사에서는 많이 하고 있고, 국내에서는 강원대학교에서 유일하게 십자화와 채소를 비롯한 다른 작물의 세포질 융성 불임성 도입과 관련된 연구를 많이 수행하고 있는 실정이다.

지금까지 많이 알려지고 도입된 세포질 융성불임특성들은 1962년 Ogura에 의하여 무에서 발견된 세포질 융성불임계통인데 Ogura 세포질 융성불임성은 저온에서 식물체가 chlorosis가 되는 현상이 나타나기 때문에 실질적인 채종에서 문제점이 많다. 많은 십자화와육종가들은 새로운 source의 세포질 융성불임계통을 식물체의 도입을 시도하여 chlorosis문제를 해결하려는 실험

들을 시도하였다. 원형질체 융합실험을 많이 하고 있는 Earle 그룹에서 1996년 처음으로 *B. oleracea*에 Anand 세포질웅성불임성을 도입하여 새로운 source의 식물체를 창출하는데 성공하였다

세포융합방법을 이용한 새로운 source의 세포질 웅성불임성 도입은 2000년 인도에서 야생종에 들어 있는 oxy 세포질 웅성불임성을 도입하여 chlorosis를 해결하였다는 연구결과를 발표하였다.

국내의 경우 역시 세포질웅성불임성을 이용한 재종체계를 확립하여 채소산업의 국제경쟁력을 향상시키는 것이 아주 시급한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적인 중요한 십자화과 채소로 부상되는 갖의 효율적인 F1 재종 체계를 만들기 위해서 원형질체 분리, 배양, 융합 조건을 확립하고, 새로운 세포질 웅성불임성 type 인 순무의 Anand 세포질 웅성 불임성을 갖으로 도입(Akagi 등 1989; Kyouzuka 등; Yang 등 1989)하는 연구가 성공적으로 수행되었기에 보고하고자 한다.

제2절 *B. rapa*의 세포질 웅성불임특성을 갖에 도입

1. 실험 재료 및 종자 소독

중앙 종묘에서 분양 받은 갖 육성계통 (inbred line) 종자(KW68)와 Crucifer Cooperation에서 분양받은 생활환이 짧고 세포질 웅성 불임성을 지닌 순무 종자(CrGC5-9)를 원형질체 분리 및 융합을 위한 재료로 사용하였다. 분양 받은 종자는 70% EtOH에 1분간 침지하여 1차 표면 소독 후 tween20을 2~3방울 첨가한 50%락스에 15분간 침지한 다음 멸균수로 3번 세척하였다.

소독된 종자를 고체 배지:MS배지(Murashige와 Skoog medium), 3%

Sucrose, 0.8% agar, pH5.6~5.8 에 파종하여 16시간 명상태와 8시간 암상태, 온도 25℃±1 조건의 배양실에서 배양하였다. 이 실험에서는 자엽과 하배축을 실험 재료로 사용하였다. 원형질체 분리 전에 자엽과 하배축을 전처리 용액에서 1㎖의 크기로 잘라주었다.

2. 원형질체 분리, 융합 및 배양

가. 원형질체 분리

원형질체 분리는 기내에서 배양한 것과 순무의 자엽과 하배축을 이용하였다. 원형질체 분리 전에 자엽과 하배축을 전처리 용액에서 1㎖의 크기로 잘게 잘라 주었다. 길게 자른 자엽과 하배축을 전처리 용액에서 배양한 후 전처리 용액을 제거하고 효소 용액(1% cellulysin(w/v), 0.5% macerozyme(w/v), 0.4M mannitol, pH5.6~5.8) 으로 처리하였다. 효소용액 처리후 50 μ m체로 거르고, 원형질체를 1000rpm으로 10분 원심분리하여 원형질체를 분리하였다. 분리된 원형질체를 새로운 원심분리 튜브에 넣고 세척용액 W5를 넣고 다시 1000rpm 10분, 2회 반복 세척한 후 혈구 계산기로 원형질체 밀도를 조절하였다.

나. 원형질체 융합

원형질체 융합 과정은 Glimelius(1986)등이 개발한 방법을 변형하여 사용하였다. 융합양친의 원형질체는 최종 농도가 1×10⁶/ml가 되도록 W5 용액으로 희석하고 융합양친을 1:1의 비율로 잘 섞은 후 지름 6cm의 페트리디쉬에 원형질체 현탁액을 넣고 5분 후에 같은 양의 35% polyethylene glycol

(K&P배지, 35% PEG w/v, mol.wt 4000, 0.3M glucose, 50mM CaCl₂ · 2H₂O)를 처리하였다. 5분 후 PEG 용액을 제거하고 배양배지로 2회 세척하였다.

다. 융합된 원형질체의 배양과 식물체의 재분화

PEG를 처리한 원형질체에 0.4M glucose와 호르몬이 첨가된 K&P배지(0.4M glucose, 1mg/ℓ 2,4-D, 1mg/ℓ NAA, 0.5mg/ℓ BAP, 0.2mg/ℓ kinetin)를 25℃ 암상태인 항온기에서 배양하였다. 융합된 원형질체로부터 분열이 활발하게 시작될 때 MS 배지에 옮겨 주었다. Callus의 크기가 지름 1~2mm 정도 되었을 때 다시 호르몬이 첨가된 재분화 배지에 옮겨 배양하였고, 줄기 재분화 양상을 관찰하였다. 재분화된 줄기를 호르몬 무첨가 배지에 계대배양한 후 뿌리를 유도시켜 온실에 순화하였다.

3. 분자생물학적 분석

가. DNA추출

CTAB방법(Fourney et al., 1989)에 의해서 융합양친과 체세포 잡종체의 DNA를 추출하였다. DNA분리를 위해서 융합 양친과 체세포 잡종체의 잎1g에 액체질소를 첨가하여 미세 분말로 만들고, Eppendorf tube에 넣고 600 μ l의 2X CTAB용액(100mM Tris-HCl pH8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 2% β -mercaptoethanol)을 첨가하여 60℃ 항온 수조에서 30분간 처리한다. tube의 온도가 50℃ 이하로 떨어지면 같은 양의 phenol:chloroform:Isoamyl alcohol 이 25:24:1로 섞인 용액을 넣고 잘 섞은 후 12000rpm, 4℃, 15분간 원심분리하였다. 상층액(약600 μ l)을 새로운 tube에 넣고 3M Sodium-acetate(pH8.0)을

1/10volume으로 넣고 전체용액의 두배만큼 100%EtOH을 넣어 -20℃에 적어도 1시간 이상 보관 후에 12000rpm, 4℃ 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 침전물을 70%EtOH로 닦아준 후 건조시켜 증류수 50 μ l을 넣어 희석하였다.

나. Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)분석

RAPD분석을 위해 primer는 10개의 염기로 구성된 OPA17(operon technologies)를 사용하였다. 50ng의 DNA 1 μ l, 25mM MgCl₂ 1.5 μ l, 10 \times reaction buffer 2.5 μ l, 10mM dNTP 0.5 μ l 5u/ μ l Taq polymerase 0.125 μ l, 100pM/l 0.1 μ l, 증류수 19.275 μ l를 넣고 잘 섞어 최종량을 25 μ l로 맞춘 후 25 μ l 미네랄 오일을 첨가하였다. DNA 증폭 조건은 94℃ 40초, 40℃ 1분, 72℃ 1분으로 25cycle을 실시한 후 마지막으로 72℃에서 10분간 증폭시켰다. 증폭된 DNA는 0.8% agarose gel로 전기영동하여 band를 확인하였다.

4. 세포학적 분석

염색체 수의 관찰

염색체 관찰을 위해 순화한 식물체의 뿌리 끝 부분을 잘라 실온에서 전처리로 8-hydroxyquinoline에 1시간 처리한 다음 고정액 (acetic acid:EtOH=1:3)에 최소 24시간 고정시켰다. 증류수에 고정시킨 뿌리 끝을 세척한 다음 효소 용액(5%cellulysin, 1%pectolyase, 10mM EDTA, pH4.5)을 처리하여 37℃ 항온 수조에 30분간 넣어 두었다. 효소 처리한 뿌리 끝을 증류수에 세척한 다음 슬라이드 글라스 위에 놓고 Acetic acid : EtOH=1 : 3용액을 1방울 떨어뜨리고 철봉으로 부순 후 Gemmsa 염색용액에 10분간 염색하여 관찰하였다.

5. 형태적 특성조사

온실에 순화한 융합양친과 체세포 잡종체의 잎의 크기와 모양, 개화기, 화기 모양과 크기를 비교·검정하였다.

6. 결과

가. 원형질체 분리, 융합 및 배양

16시간 명상태, 8시간 암상태, 온도 $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ 조건의 배양실에서 배양한 융합 양친의 자엽과 하배측에 효소를 처리하여 다량의 원형질체를 얻을 수 있었다 (그림1-1) 원형질체 융합은 Glimelius 등 (1986)의 방법을 변형하여 사용하였다. 그리고 고효율의 세포 융합 방법을 이용하기 위해서는 융합 후 체세포 잡종 세포를 선별하는 방법을 이용해야 한다(Yamagishi 등 1992). 십자화과에서는 Glimelius 등(1986)은 80%정도만큼의 이형접합자를 얻기 위해서 세포분류 방법(cell sorting method)을 이용했으나 이 방법은 세포분류기(cell sorter)와 같은 특별한 시설을 필요로 하게 되었다(Yamagishi 등 1992). 본 실험에서는 잡종세포를 분류하기 위해 어떠한 방법도 사용하지 않았으며, Hansen과 Earle(1994) 또한 어떠한 세포분류기나 감마선(γ -ray) 조사없이 십자화과 사이의 체세포 잡종체를 얻을 수 있었다.

이렇게 융합 양친의 분리된 원형질체는 최종 농도가 1×10^6 개/ml이 되도록 W5용액으로 희석하였고, 융합 양친이 1 : 1의 비율로 융합하였다(그림1-2). PEG처리 후, 원형질체는 배양배지로 2회 세척하였다. PEG를 처리한 원형질체는 1mg/l 2,4-D, 1mg/l NAA, 0.5mg/l BAP, 0.2mg/l Kinetin이 첨가된 K&P배지에서 배양되었다. 융합된 원형질체에서 분열이 활발하게 시작될 때 (그림1-3) 0.15% Agarose가 첨가된 재분화 배지로 옮겨 배양하였다.

(그림1-4) 재분화 배지로 옮겨 배양한 후 캘러스로부터 줄기가 재분화되었다. 원형질체에서 얻어진 캘러스에서 재분화된 식물체는 재분화배지의 조성에 따라 캘러스에서 식물체가 재분화되거나 embryogenesis한 형태도 관찰되었다.(그림 33)

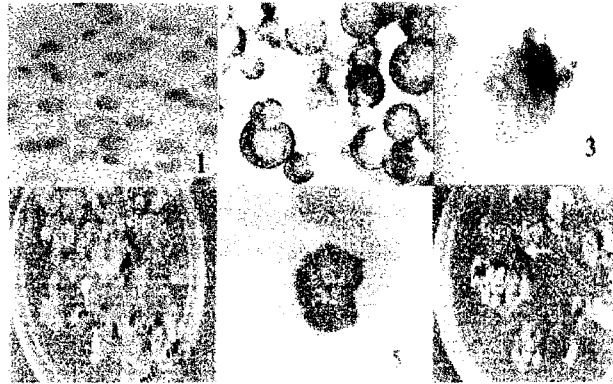


그림 33. 융합된 원형질체로부터 식물체 재분화
 1. 원형질체 나출 2. 원형질체 융합 3. 세포분열
 4. Microcalli 형성 5. 체세포배 형성 6. 식물체 재분화

나. 분자생물학적 분석

1) RAPD분석

세포융합 방법에 의해 얻어진 체세포 잡종 식물체를 PCR법에 의하여 지놈 DNA의 RAPD밴드 양상을 조사한 결과는 그림 2와 같다. 밴드의 양상은 primer에 따라 다르게 나타났는데 그 중 OPA17에서 가장 큰 차이를 보였다.

체세포 잡종 식물체는 서로 다른 융합양친의 밴드를 모두 가지고 있었으며 이것은 세포융합에 의해 양친이 융합되어 재분화된 체세포 잡종 식물체임을 확인할 수 있었다(그림 34).

M P1 P2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

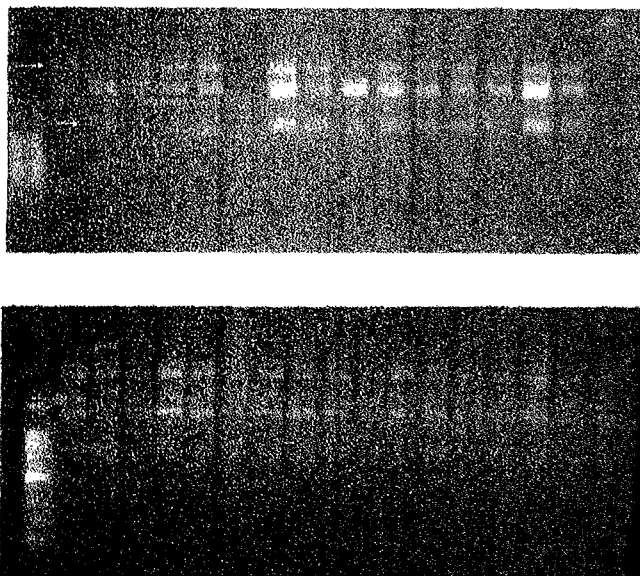


그림 34. RAPD 분석방법에 의한 체세포잡종체의 융합여부검정

윗그림은 OPA17을 primer로 사용한것이며 아래그림은 OPA1을 primer로 사용하여 증폭한 DNA의 양상

다. 세포학적분석

세포학적 분석을 기초로 하여 체세포 잡종체는 $2n=56$ 개의 염색체를 가지고 있었다. 이것은 *Brassica rapa*($2n=20$)와 *Brassica Juncea*($2n=36$)의 염색

체 수를 합한 것과 같았다. 따라서 체세포 잡종 식물체가 복이배체일 것이라고 추정되며, 이에 따라 체세포 잡종 식물체의 형태학적 특징은 잎의 다양한 엽맥 형태와 색깔, 모양 그리고 크기를 나타낼 것이다(그림 35).

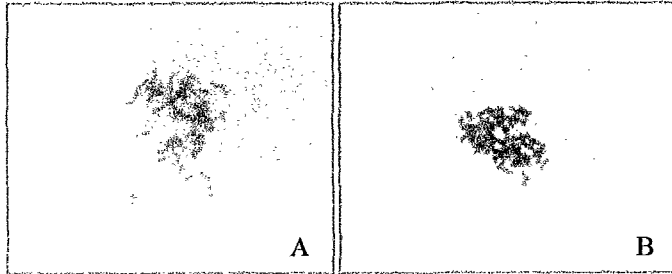


그림 35 엽색체수 관찰에 의한 체세포잡종체의 확인

라. 형태적 특성조사

융합양친과 체세포 잡종 식물체의 가장 현저한 차이점은 잎의 형태에 있었다. 그림에서 보는 바와 같이 체세포 잡종 식물체의 엽병모양은 갓(KW68)의 넓고 긴 모양, 순무(CrGC 5-9)의 가는 모양의 중간형태를 하고있었다.

또한 갓 엽병의 색깔은 보라색을 띄는 반면에 순무의 엽병과 체세포 잡종체의 엽병은 비슷한 색깔을 띄고 있으며, 또한 순무는 결각이 있는 잎모양이지만 갓과 체세포 잡종체의 잎은 결각이 없다. (그림 36)



그림 36. 융합재료인 갓과 *B. rapa* 및 체세포잡종식물체의 싹형태비교

갓: kw68, S.H. Somatic hybrid, CrGC5-9: *B. rapa*

융합양친과 체세포 잡종체는 또한 개화기에서도 차이를 보였다. 생활환이 짧은 순무는 온실에 순화한 후 3주 정도 되었을 때 개화하였고 체세포 잡종체 중 일부는 순무보다 비슷하게 개화하였다(그림37)



그림 37. 체세포잡종식물체와 융합재료들의 추대 개화 비교

좌: 갓, 중: 체세포잡종체, 우: *B. rapa*



그림 38. 수술이 변형되어 꽃잎으로 변한 체세포잡종체

화기의 모양을 비교하여 관찰한 경우에 세포질 융성 불임성을 갖고 있는 순무의 화기는 정상적으로 암술과 수술 모두 있으나 수술의 화분이 수정능력이 없어 종자 형성을 할 수 없었고, 체세포 잡종체의 화기는 암술은 있지만 수술이 꽃잎으로 변형된 비정상적인 형태였다. (그림 38)

제 2 절 *B. oleracea* 의 세포질 응성불임특성의 *B. juncea*에로의 도입

1. 원형질체 분리, 융합, 배양 및 식물체 재분화

중앙종묘에서 분양받은 세포질 응성불임 특성을 가진 브로콜리 (kw105) 와 결구 갓(kw68)의 순계line들을 30% 유한락스로 표면 살균하여 기내에 파종하여 MS 2%배지에 유지시켰다. 종자가 기내에서 발아하여 2-3일 지나 자엽이 전개되고 본 엽이 나오기 전의 자엽과 하배축을 원형질체 융합 재료로 이용하였다. 자엽과 하배축을 전처리 용액에서 잘게 자른 후 효소처리를 하여 세포벽을 제거하여 원형질체를 분리시켰으며 분리된 원형질체는 정제와 세척 과정을 거친 다음 혈구계산기로 원형질체 개수를 측정하여 밀도를 조절하여 융합을 시켰다.

융합된 세포는 k8p 배양배지에 일정한 농도의 식물생장조절제를 첨가하여 배양하였다. 배양3-7일 후 세포들이 왕성하게 분열하기 시작하였을 때 세포들은 반고체 배지에 옮겨 주었으며 캘러스가 2-3mm정도의 크기가 되면 MS 3%에 Zeatin 5mg/l, IAA 2mg/l를 첨가한 재분화 배지에 옮겨 재분화를 유도시켰다. 캘러스는 2-3주 한번씩 계대 배양하여 주었다. 식물체는 2% 배지에서 0.2mg/l의 NAA가 들어간 배지에서 뿌리를 유도시켜 포트에 순화시켰다(그림 39).

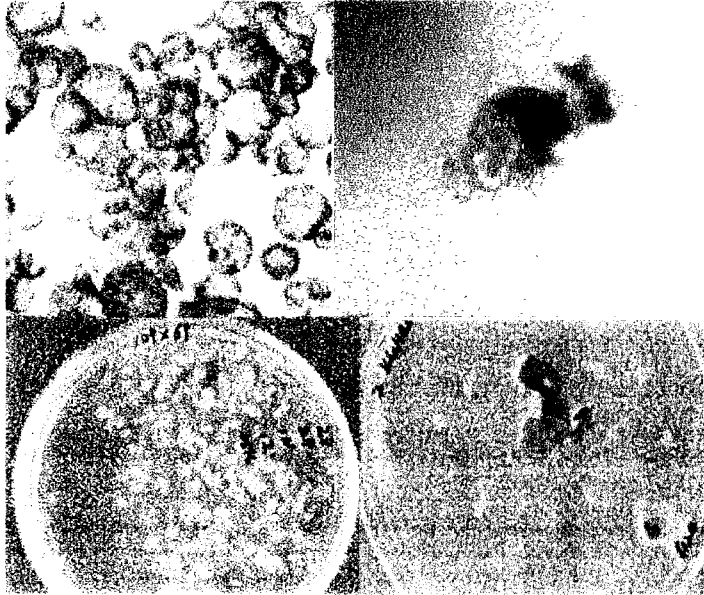


그림 39. 분리된 원형질체가 분열하고 식물체로 재분화되는과정

2. Ogura CMS 특정 primer를 이용한 PCR 방법에 의한 재분화된 식물체의 세포질 융성불임특성검정

PCR 방법을 위하여 Ogura CMS 특정 primer를 사용하였다. 무의 mitochondria OrfB locus에서 제작된 특정 Primer들을 이용하였다. 이 primer 들은 일찍 미국 conell 대학의 원형질체 융합팀인 Earle 십자화과 채소의 융합체의 세포질 융성불임특성을 검증하였던 바가 있다.

PCR 반응은 150ng의 DNA $1\mu\text{l}$, 25mM MgCl_2 $1.5\mu\text{l}$, $10\times$ reaction buffer $2.5\mu\text{l}$, 10mM dNTP $0.5\mu\text{l}$ $5\text{u}/\mu\text{l}$ Taq polymerase $0.125\mu\text{l}$, $100\text{pM}/\text{l}$ $0.1\mu\text{l}$, 증

류수 19.275 μ l를 넣고 잘 섞어 최종량을 25 μ l로 맞춘 후 25 μ l 미네랄 오일을 첨가하였다. DNA 증폭 조건은 94 $^{\circ}$ C 40초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 30cycle을 실시한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 유지시켰다. 증폭된 DNA는 0.8% agarose gel로 전기 영동하여 band를 확인하였다

PCR결과 융합 모본들 중 세포질융성불임특성을 가지고 있는 브로콜리가 500bp에서 특정밴드를 나타냈으나 갓(kw69)에서는 모두가 500bp에서 Ogura 세포질융성불임특성 특정밴드가 나타난 것으로 보아 재분화된 식물체들이 세포질융성불임특성을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.

M 69 105 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

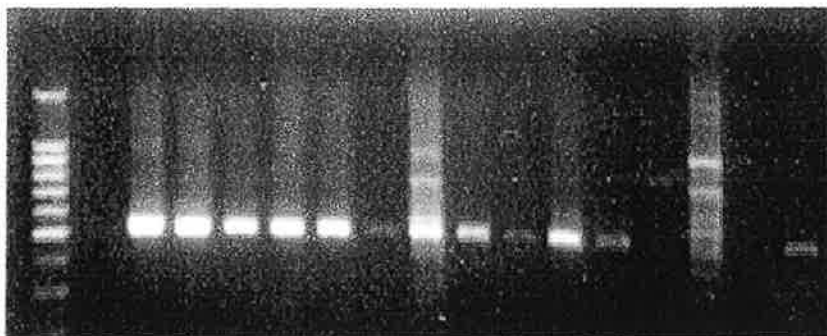


그림 40. PCR 분석에 의한 세포질 융성불임특성 검정

kw69: CMS가 아닌 갓, kw105: CMS인 브로콜리

1-10, 12, 14: CMS 특성트 지닌체세포잡종식물 11&13: CMS특성이 도입되지 않음

3. Southern blot hybridization 방법에 의한 세포질 응성불임특성검정

Southern은 위에서 확인 PCR산물을 gel 에 전기영동하고 membrane에 옮긴 다음 hybridization 과 detection으로 세포질 응성불성을 도입하고자 하였다. southern blot hybridization 에 이용된 Ogura 세포질응성불임특성을 가진 CrGC3-7의 Ogura CMS 특성의 DNA를 labelling 하여 사용하였다.

14개의 체세포잡종식물체중 비록 PCR 에서는 OGura CMS특정밴드가 나타났지만 southern 결과에서 5,7에서 추가로 밴드가 나타나지 않은 것으로 나타났다(그림 41).

69 105 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



그림 41. Southern blot hybridization 방법에 의한 세포질응성불임특성확인

4. 염색체수 관찰에 의한 융합여부의 확인

염색체 관찰을 위해 순화한 식물체의 뿌리 끝 부분을 잘라 실온에서 전 처리로 8-hydroxyquinoline에 1시간 처리한 다음 고정액 (acetic acid:EtOH=1:3)에 최소 24시간 고정시켰다. 증류수에 고정시킨 뿌리 끝을 세척한 다음 효소 용액(5%cellulysin, 1%pectolyase, 10mM EDTA, pH4.5)을 처

리하여 37℃ 항온 수조에 30분간 넣어 두었다. 효소 처리한 뿌리 끝을 증류수에 세척한 다음 슬라이드 글라스 위에 놓고 Acetic acid : EtOH=1 : 3용액을 1방울 떨어뜨리고 핀셋으로 부순 후 Gemmsa 염색용액에 10분간 염색하여 관찰하였다. 현미경에서 염색체수를 관찰한 결과 염색체는 거의 44개로 나타났다(그림 42)



그림 42. 브로콜리와 갯의 체세포잡종식물체의 현미경하에서 관찰한 염색체
갯: $2n=36$, 브로콜리 $2n=18$

5. 융합체와 모본들의 형태적인 비교

갯과 브로콜리 사이의 융합체들간 형태상에서 큰 변이를 보이지 않았다. 식물체들은 외관상으로 갯에 가까웠으나 절간 신장이나 잎의 형태는 브로콜리와 비슷한 것으로 나타났다.

갯은 결구형식은 포피형이며 브로콜리는 비결구형이다. 재분화된 식물체의 결구양상을 관찰하여 보았을 때 비결구 형이었는데 이는 비결구형인 브로콜리의 특성과 비슷하였다(그림 43).



그림 43. 갓 브로콜리 및 체세포잡종체의 형태

상: 갓, 중: 브로콜리, 하: 체세포잡종식물체

엽형이 브로콜리에 가까웠으나 엽색이나 엽맥의 형태는 갓과 아주 비슷하였으며 엽병은 대부분 브로콜리처럼 3원형었다.

엽형이 갓에 가까운 형태를 가졌으나 신장과 줄기의 직경으로 보아 브로콜리의 형질이 나타나는 것으로 판단되었다. 그러나, 잡종식물체의 맛에 있어서는 갓의 형태를 나타내는 개체들이 갓 특유의 풍미를 가지고 있었다(그림44).

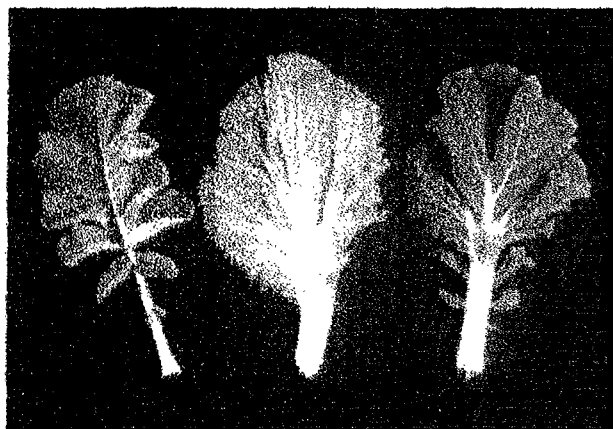


그림 44. 융합재료들과 체세포잡종식물체의 엽형의 비교
좌: 브로콜리, 중:갓, 우:체세포잡종식물체

6. 추대양상에 의한 융합체의 비교

체세포잡종식물체들은 9월6일에 포트에 순화되어 유리온실에서 재배하였다. 자연적인 조건하에서 식물체들은 2개월이 되어 꽃대가 올라오기 시작하였다. 융합모본들중 브로콜리가 융합체들과 비슷하게 추대되었으나 갓은 아직도 추대되어 있지 않는 상태로 보아 추대성은 브로콜리와 비슷한 것으로 보아진다. 그러나 꽃대가 올라오는 양상은 브로콜리와는 다르게 갓과 아주

비슷하게 나타내고 있다. 브로콜리의 화기 정단부의 분지양식은 불규칙적으로 작은 꽃 덩이가 뭉쳐진 하나의 촘촘한 화총이지만 재분화된 식물체의 대부분은 끝이 분지되면서 총상화서를 가진 비대줄기이다(그림 45).



그림 45. 브로콜리와 갓 및 체세포잡종식물체의 개화습성비교

브로콜리, 중: 체세포잡종체, 하: 갓

제 9 장 Multi-fusion 방법 개발에 의한 세포질 융성불임특성을 갖으로의 도입

제 1 절 서 설

갯의 원산지는 중앙아시아로부터 히말라야지역설이 있다. 바빌로프 등의 학설로 종합하면 갯은 지중해지역에 야생하는 *B. campestris* 와 *B. nigra*가 자연교잡되어 나타난 것을 추정되고 있다. 그후 기름용으로는 인도에서 채소용으로는 중국에서 품종으로 분화되었다.

갯은 일반적으로 황갯, 흑갯, ornamental 갯으로 나누어져 있는데 일반적으로 단백질 무기물인 칼슘, 철 당질인 포도당, 자당 비타민 A, B, C등의 함량이 다른 채소에 비해 높다. 비타민 A는 그 모체가 되는 카로틴의 형태로 들어있는데 소금 절임을 해도 생것 못지 않게 식품가치가 높다.

국내에서 갯 종자는 대부분 일본에서 수입하고 있는데 종자수입에 가격의 부담으로 자가 채종을 하고 있다. 이에 따라 종자의 퇴화와 품질저하가 문제되기 때문에 종자 채종 체계를 확립하는 것이 매우 필요하다.

일반적으로 십자화와 채소 채종은 자가불화합성을 이용하여 F1종자생산을 한다. 그러나 자가 불화합성이 높다고 할지라도 70%정도이기 때문에 순수한 F1종자생산은 어렵다. 만약 갯에서 융성불임특성을 이용한 채종 체계를 확립한다면 자가불화합성의 한계성을 극복할 수 있으며 순도검정에 들어가는 막대한 비용도 줄일 수 있고 종자순도로 인한 종자회사와 농가의 분쟁을 줄일 수 있다.

식물육종에서 재배작물의 형질을 개선하기 위한 수단으로 잡종방법을 널리 이용하고 있다. 재배작물에서 이러한 방법을 이용에 있어서 근본적인 이유는 재배작물에 바람직한 형질들이 부족하거나 gene pool에 다양성이 부족하다는 것이다. 현대생명공학 예를 들면 체세포잡종과 형질전환방법들을 이용하여 유연 관계가 멀거나 비슷한 작물들에서 유용한 유전자들을 도입시킬 수 있다.

체세포잡종방법은 재래적인 육종방법과는 달리 몇 가지 특성이 있다. 첫째 완전한 두 개의 게놈의 조합이기에 이질 복이배체를 형성할 수 있다. 둘째 비대칭적인 잡종생산을 위한 부분적 게놈의 전이 수여친으로 사용할 식물의 게놈을 방사성 조사로 여러 개로 조각을 낸후 수여친의 게놈과 융합을 하는 방법이다. 셋째 공여친으로부터 핵을 받고 수여친으로부터 세포질을 받는 식의 융합방법이다.

이러한 대칭융합방법이나 비대칭 융합방법으로 많은 체세포 잡종체들이 얻어졌으면 실질적으로 생산에 이용되고 있는 종들도 있다.

원형질체 융합을 통한 특정형질의 도입은 활발하게 이루어져 왔고 지속적인 발전을 가져오고 있는 상태이지만 융합은 두 가지 종의 식물체를 융합 재료로 하여 실험들을 수행하였다.

본 연구의 목적은 배추 브로콜리 갖의 원형질체를 이용한 Multi-fusion 방법으로 배추와 브로콜리의 세포질용성불임특성을 갖으로 도입하고자 하였으며 재분화된 식물체의 형태적인 비교로부터 multifusion 방법으로 더 다양한 육종소재를 만들 수 있다는 가능성을 제시하고자 하며 재분화된 식물체의 분자생물학적 세포학적인 방법으로 융합여부를 검증하고 세포질 용성불임특성을 검정하고자 수행하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 종자 소독

중앙 종묘에서 분양 받은 육성계통종자 (inbred line) *B. campestris*(배추 KW67), *B. oleracea*(브로콜리 kw105)과 *B. juncea*(갓 kw68)을 원형질체 분리 및 융합을 위한 재료로 사용하였다. 분양 받은 종자는 70% EtOH에 1분간 침지하여 1차 표면 소독 후 tween20을 2~3방울 첨가한 50%락스에 15분간 침지한 다음 멸균수로 3번 세척하였다.

소독된 종자를 고체 배지:MS배지(Murashige와 Skoog medium), 3% Sucrose, 0.8% agar, pH5.6~5.8 에 파종하여 16시간 명상태와 8시간 암상태, 온도 25℃±1 조건의 배양실에서 배양하였다. 배양 3-7일이 지난 식물의 자엽과 하배축을 실험 재료로 사용하였다.

2. 원형질체 분리, 융합 및 배양

가. 원형질체 분리

원형질체 분리는 기내에서 배양한 배추와 브로콜리 갓의 자엽과 하배축을 이용하였다. 원형질체 분리 전에 자엽과 하배축을 전처리 용액에서 사방 0.5mm 크기로 잘게 잘라 주었다. 길게 자른 자엽과 하배축을 전처리 용액에서 배양한 후 전처리 용액을 제거하고 효소 용액(1% cellulysin(w/v), 0.5% macerozyme(w/v), 0.4M mannitol, pH5.6~5.8) 으로 처리하였다. 효소용액 처리후 50 μ m체로 거르고, 원형질체를 1000rpm으로 10분 원심분리하여 원형질

체를 분리하였다. 분리된 원형질체를 새로운 원심분리 튜브에 넣고 세척용액 W5를 넣고 다시 1000rpm 10분, 2회 반복 세척한 후 혈구 계산기로 원형질체 밀도를 조절하였다.

나. 원형질체 융합

원형질체 융합 과정은 Glimelius(1986)등이 개발한 방법을 변형하여 사용하였다. 세가지 융합실험에 이용될 개체들의 원형질체는 최종 농도가 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 가 되도록 W5 용액으로 희석하고 융합양친을 1:1:1의 비율로 잘 섞은 후 지름 6cm의 페트리디쉬에 원형질체를 7방울씩 떨어뜨려서 5분이 지난 후 같은 양의 35% polyethylene glycol (K&P배지, 35% PEG w/v, mol.wt 4000, 0.3M glucose, 50mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 처리하였다. 5분 후 PEG 용액을 제거하고 배양배지로 두 번 washing 한다.

다. 융합된 원형질체의 배양과 식물체의 재분화

PEG를 처리한 원형질체에 0.4M glucose와 호르몬이 첨가된 K8P배지(0.4M glucose, 1mg/ℓ 2,4-D, 1mg/ℓ NAA, 0.5mg/ℓ BAP, 0.2mg/ℓ kinetin)를 25°C 암상태인 항온기에서 배양하였다. 융합된 원형질체로부터 분열이 활발하게 시작될 때 0.1% agarose 반고체 배지에 식물생장조절제를 1/4로 낮추어 옮겨 주었다.

효율적인 원형질체의 배양방법을 구명하기 위하여 원형질체 배양을 agarose alginate bead 방법으로 배양하였다. Callus의 크기가 지름 1~2mm 정도 되었을 때 다시 호르몬이 첨가된 재분화 배지에 옮겨 배양하였고, 줄기 재분화 양상을 관찰하였다. 재분화된 줄기를 호르몬 무첨가 배지에 계대배양

한 후 뿌리를 유도시켜 온실에 순화하였다.

3. 분자생물학적 분석

가. DNA추출

CTAB방법(Fourney et al., 1989)에 의해서 융합양친과 체세포 잡종체의 DNA를 추출하였다. DNA분리를 위해서 융합 양친과 체세포 잡종체의 잎1g에 액체질소를 첨가하여 미세 분말로 만들고, Eppendorf tube에 넣고 600 μ l의 2X CTAB용액(100mM Tris-HCl pH8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 2% β -mercaptoethanol)을 첨가하여 60 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 30분간 처리한다. tube의 온도가 50 $^{\circ}$ C 이하로 떨어지면 같은 양의 phenol:chloroform:Isoamyl alcohol 이 25:24:1로 섞인 용액을 넣고 잘 섞은 후 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15분간 원심분리하였다. 상층액(약600 μ l)을 새로운 tube에 넣고 3M Sodium-acetate(pH8.0)을 1/10volume으로 넣고 전체용액의 두배만큼 100%EtOH을 넣어 -20 $^{\circ}$ C에 적어도 1시간 이상 보관 후에 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 침전물을 70% EtOH로 닦아준 후 건조시켜 증류수 50 μ l을 넣어 희석하였다.

나. Ogura CMS 특정 primer를 이용한 융합체의 세포질웅성불임특성확인

PCR 방법을 위하여 Ogura CMS 특정primer를사용하였다. 무의 mitochondria OrfB locus에서 제작된 특정 Primer들을 이용하였다. 이 primer 들은 일찍 미국 conell 대학의 원형질융합팀인 Earle 십자화과 채소의 융합체의 세포질 웅성불임특성을 검증하였다.

PCR 반응은 150ng의 DNA 1 μ l, 25mM MgCl₂ 1.5 μ l, 10 \times reaction buffer 2.5 μ l, 10mM dNTP 0.5 μ l 5u/ μ l Taq polymerase 0.125 μ l, 100pM/l 0.1 μ l, 증류수 19.275 μ l를 넣고 잘 섞어 최종량을 25 μ l로 맞춘 후 25 μ l 미네랄 오일을 첨가하였다. DNA 증폭 조건은 94 $^{\circ}$ C 40초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 30cycle을 실시한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 유지시켰다. 증폭된 DNA는 0.8% agarose gel로 전기영동하여 band를 확인하였다

다. Southern blot hybridization 방법에 의한 융합여부 검정

PCR 반응물을 agarose gel 에 전기영동하여 nylon membrane에 옮긴후 hybridization과 detection으로 확인하였다.

4. 세포학적 분석

염색체 수의 관찰

염색체 관찰을 위해 순화한 식물체의 뿌리 끝 부분을 잘라 실온에서 전 처리로 mono-bromonaphthalene으로 1시간 처리한 다음 고정액 (acetic acid:EtOH=1:3)에 최소 24시간 고정시켰다. 증류수에 고정시킨 뿌리 끝을 세척한 다음 효소 용액(5%cellulysin, 1%pectolyase, 10mM EDTA, pH4.5)을 처리하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에 30분간 넣어 두었다. 효소 처리한 뿌리 끝을 증류수에 세척한 다음 슬라이드 글라스 위에 놓고 Acetic acid : EtOH=1 : 3용액을 1방울 떨어뜨리고 핀셋으로 잘 퍼지게 한 다음 자연 건조시킨다. 건조시킨 슬라이드는 다시 5% Gemmsa 염색용액에 10분간 염색하여 관찰하였다.

5. 포트로 순화 및 형태적 특성조사

재분화된 식물체를 3% MS배지에 0.2mg/l의 NAA를 넣어서 발근시켜 원예상에 옮겼다. greenhouse에서 성장한 식물체의 잎의 형태 엽병의 형태 그리고 개화기를 비교하여 융합여부를 검정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 원형질체 분열 및 캘러스로부터 식물체 재분화

multifusion과정을 거친 세포들을 k8p 배지에 1mg/l 2,4-D, 0.5mg/l BAP, 1mg/l NAA, 0.2mg/l kinetin을 첨가하여 배양한지 3일후부터 분열을 시작하였으며 배양7일후 petri dish에 작은 세포군들이 생기기 시작하였을 때 반고체 배지에 옮겨주었다.

가. Agarose배양방법

세포군이 형성되었을 때 배지에 0.15%의 agarose 배지에 옮겨 배양하였을 때 처음에는 세포군이 연한 갈색으로 변하다가 점차적으로 세포가 다시 왕성하게 분열하는 현상을 관찰 할 수 있었다. agarose 반고체 배지에서 세포들의 초기생장을 조금 느린 것 같았으나 배지 후기생장은 아주 좋았다.

나. Alginate bead 배양

Alginate bead 방법을 사용한 시기는 agarose 배양과 같은 시기에 진행하였다. alginate 배양시 초기 배양에서는 세포가 왕성하게 분열하였으나 시간이 지남에 따라 bead에 둘러싸인 세포들이 갈색으로 변하는 현상을 관찰 할 수 있었다. 이때 신선한 액체 배지를 교체해 줌으로써 어느 갈변을 어느

정도 억제할 수 있었으나 agarose 배양방법보다는 갈변억제 정도가 낮은 것을 관찰할 수 있었다.

다. 액체 평판 배양방법

원형질체 배양방법에서 있어서 액체 평판배양을 하면서 주기적으로 삼투조절물질의 농도를 조절할 수 있는 이점이 있기 때문에 널리 이용되는 배양방법이다. 본연구에서 액체평판방법으로 배양하였을 때 초기 배양에서는 세포분열을 왕성하게 유도할 수 있었으나 배양중기부터 갈변이 심해지면서 세포분열이 중지되면서 세포가 죽는 현상들을 관찰할 수 있었다. 이것은 원형질체 용합시 파괴된 세포에서 분비하는 polyphenolic 물질들이 세포의 생장에 영향을 준다는 보고들도 있다.

agarose 배양방법이나 alginate bead 배양방법이 액체평판배양방법보다 갈변이 적게 되는 것은 세포가 agarose 나 alginate 와 같은 교질물질에 둘러 쌓여 있으므로 외부 독성 물질과의 직접적인 접촉을 피할 수 있기 때문에 세포가 상대적으로 스트레스를 적게 받기 때문이라고 생각된다. 뿐만 아니라 agarose 나 alginate 로 세포가 둘러 쌓여 있기 때문에 세포 신진대사과정에서 생성되는 2차 대사물질들이 외부로의 유출이 줄어들기 때문에 세포 생장에 유리하다는 보고도 있다.

아울러 십자화과 원형질체 배양에 있어서 초기분열이 이루어진 후 세포 군들을 반고체배지로 옮겨주는 것이 바람직하다.

세포들이 반고체배지에서 2-5mm크기로 성장하면 세포들을 재분화 배지에 옮겨 주었다. 실험결과 932개의 캘러스를 획득하여 재 분화 배지에 옮겨 재 분화를 유도 시켰다.

배지로는 3% MS 기본배지에 5mg/l zeatin 2mg/l IAA을 첨가하여 사용하였다. 캘러스는 2-3주에 한번씩 계대배양하였다. 결과 캘러스로부터 20%의 식물체가 재분화 되었다. 캘러스의 배양조건들이 같았지만 식물체들이 재분

화되어 나오는 상태는 아주 다양하였다. 어떤 캘러스에서 녹색의 싹이 형성되었으나 어떤 캘러스에서 보라색 싹들이 형성되었다.

대부분 캘러스에서 multiple shooting 이 형성되었다. 재분화된 식물체들은 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS 3%배지에 옮겨 주었다. 이 배지에서 식물체들은 정상적으로 발근하였다. 재분화된 식물체들은 외관상 정상적인 형태를 나타내었다(그림 46).

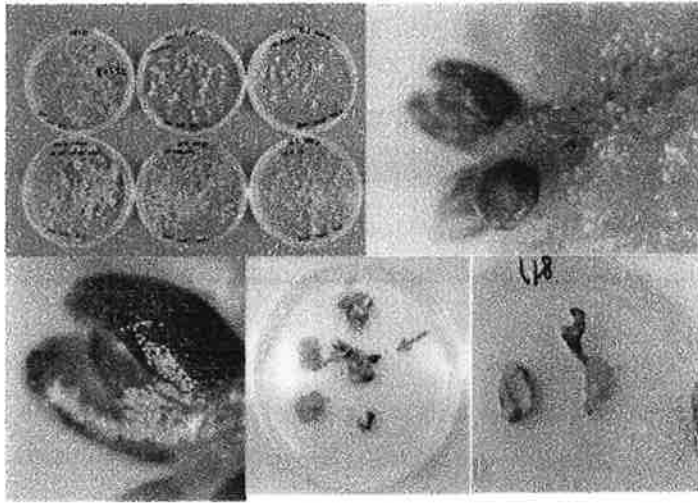


그림 46, Multi-fusion 방법으로 융합된 세포들이 분열하여 식물체로 재분화되는 과정

2. PCR 방법에 의한 재분화된 식물체들의 세포질융성불임특성검정

PCR 조건은 200ng의 DNA에 2.5mM dNTP, 10X buffer, 1.25U Taq polymerase, 20pmol의 primer를 첨가하여 반응물을 50 μ 로 하였다. 반응물은

먼저 94℃에서 2분간 변성시킨 다음 94℃에서 30s, 51℃에서 1m, 72℃에서 2m 씩 30cycle을 증폭시킨후 72℃에서 2분간 유지시켰다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 EtBR 로 염색하여 UV에서 밴드의 양상을 관찰하여 667 polarloid 필름으로 인화하였다.

96개의 식물체들을 PCR 방법으로 증폭시켜 확인한 결과 4개의 식물체가 세포질 융성불임 특성을 지닌 특정밴드가 나타나지 않았을 뿐 나머지 개체들은 모두 500bp 특정밴드가 나타나서 그 개체들이 세포질 융성불임특성을 지닌 개체들임을 확인 할 수 있었다(그림 47).

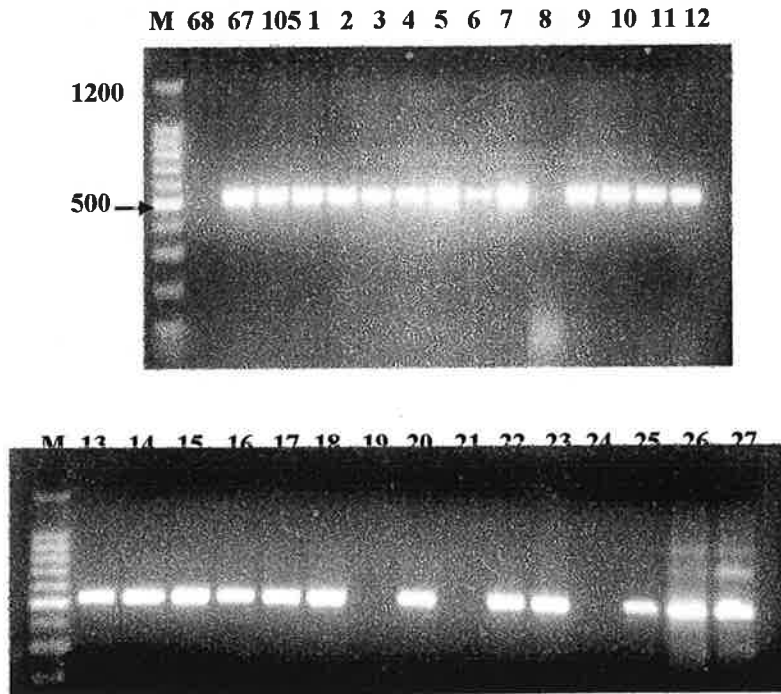


그림 47. CMS 특정 primer를 이용한 PCR분석방법에 의한 체세포잡종식물체의 CMS특성 검정

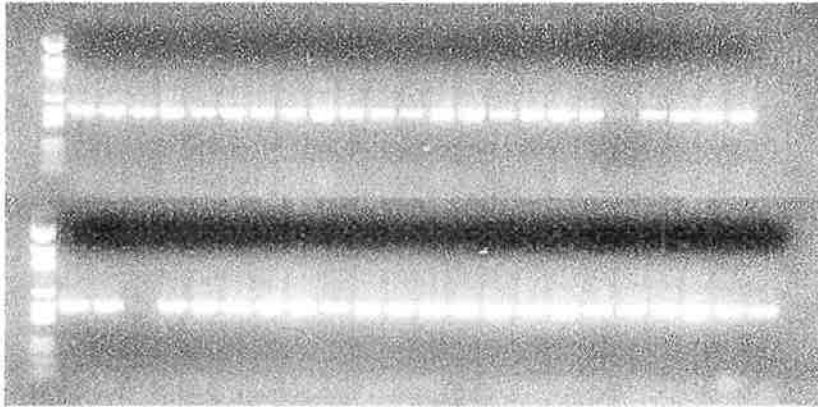


그림 47. CMS 특정 primer를 이용한 PCR분석방법에 의한
체세포잡종식물체의 CMS특성 검정(계속)

3. Southern blot hybridization 방법에 의한 검정

Southern blot hybridization 분석은 Ogura 특정 primer를 이용한 PCR 반응물을 이용하였다. PCR반응에서 얻어진 산물을 1% agarose gel 에 전기영동 시킨다음 nylon membrane에 옮긴다음 hybridization 과 detection으로 분석실험을 수행하였다. Sample은 95개의 개체중 13개를 무작위로 선발하였다. 융합재료와 sample 16개중 CMS가 아닌 kw68번에서는 아무런 DNA 밴드양상도 보이지 않았으나 나머지 개체들에서는 모두 세포질 응성불임특정 밴드가 나타났다. PCR 분석에서 뿐만아니라 Southern hybridization 방법에 의한 CMS

특성이 확인된 것으로 보아 비록 개체들간에 형태적으로 갓과 비슷하게 보여도 체세포잡종식물체임을 확인할 수 있으며 CMS특성이 도입되었음을 확인할 수 있었다(그림 48).

67 105 68 1-2 2-1 5-2 6-4 8 9-4 7-2 10-111-114-1 15-120-1 24-1



그림 48. Southern blot hybridization 방법에 의한 체세포잡종식물체의 확인 및 세포질융성불임특성 도입 확인

4. 염색체 관찰에 의한 융합여부

Root tip을 제5장에서 설명한 방법으로 고정하여 현미경하에서 관찰하였다. 배추 염색체는 $2n=20$, 브로콜리는 $2n=18$, 갓은 $2n=36$ 이다 세 가지 식물체를 체세포 융합시켰을 때 염색체의 재조합 확율이 두 가지 세포를 융합하였을 때 보다 더 복잡할 것이며 염색체수도 다양할 것이다. 뿌리끝 염색체 관찰로부터 체세포잡종식물체의 염색체는 일정하지 않고 36-46개의 다양한 염색체 수를 관찰할 수 있었다. 염색체 수 관찰에서 어떤 식물체는 비록 갓과 같은 염색체의 수를 관찰할 수 있었으나 포트에서 식물체의 형태는 브로콜리와 아주 흡사하였다. 비록 염색체수 관찰에 의한 방법으로 융합여부를 알 수 있지만 GISH 나 FISH방법으로 진일보 분석이 필요하다고 생각된다.

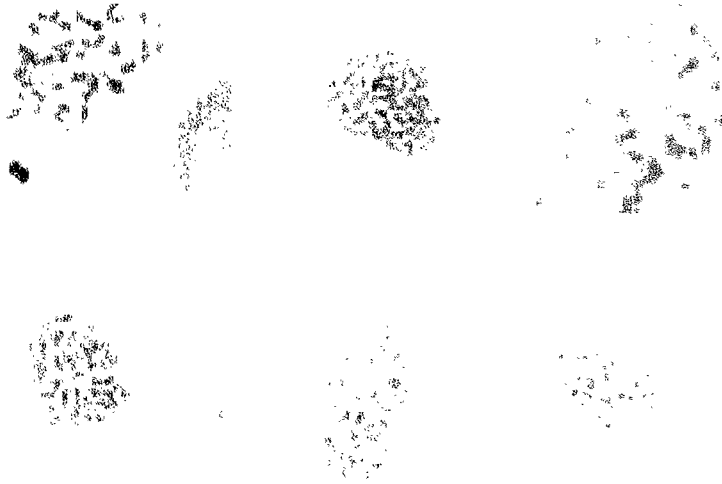


그림 49. 세포융합체의 연색체 관찰사진

5. 포트에 순화 및 형태적인 비교

가. 기내식물의 포트에로 순화

기내에서 성장한 식물체를 검정하고 후대를 유지하기 위하여는 외부조건에 적응하도록 순화의 과정이 필요한데, 기내에서 연약하게 성장한 식물체를 순화하는 과정에서 많은 어려움을 겪어오고 있다.

본 과제를 통하여 획득된 융합 식물체를 순화하는 과정에서 순화가 가장 성공적으로 수행된 경우는 배추 × 갓 × 브로콜리 융합잡종식물체의 경우이다. 이들 잡종 식물체는 기내에서 꺼내어 순화하는 과정에서 96개의 식물체가 한주의 결주도 없이 정상적으로 활착하였다. 이는 배추과 작물의 생육에 적합한 시기에 순화를 시도한 때문으로 풀이된다. 따라서 배추과 작물에 있어서 기내의 식물체를 순화하기 위한 적절한 시기는 9월 중순부터 10월 중순까지의 기간으로 판단된다.

어렵게 획득한 재분화 식물체를 순화하는 과정에서 겪는 어려움을 극복할 수 있는 좋은 방법으로 생각된다. 획득 식물체를 기내에서 유지하고 외기 조건이 대상 작물의 생육에 적합한 시기에 순화를 시도함으로써 활착율을 증가시키고 건전한 생장을 도모하여 보다 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 생각된다.

기내에서 배양한 잡종식물체를 외부 환경 조건에 순화하기 위한 과정에서 주의하여야 할 사항은 기내에서 포화습도에 가까운 상태에서 생장하였으므로 순화 초기의 습도 조건을 포화 상태에 가깝도록 유지하여 주는 것이 중요하며, 배양실 내에서는 자연광에 비하여 약광 조건이므로 차광망이나 부직포 등을 이용하여 차광을 실시하고 순화의 진행에 따라 차광율을 조절하여 주는 것이 중요한 것으로 생각된다.

또한 순화한 식물체는 초세가 약하므로 질소성분이 다소 높은 비료를 시비하여 초기에 초세를 회복하는 것이 순화 이후 식물체의 정상적인 생장을 유지하는 데에 중요한 것으로 생각된다.

초기 순화 과정에 작은 소형 포트에 순화하고 뿌리의 발육이 상당 부분 진행되면 곧바로 큰 포트에 이식하는 것이 좋을 것으로 판단되는데, 초기 순화에 밀도가 낮고 보습력과 통기성이 높은 배양토를 사용하여 순화하고 큰 포트에 옮길 때에는 정상적인 밀도를 가진 배양토로 교체하는 것이 생육이

좋은 것으로 평가되었다.

초기 순화용 배양토는 비료성분의 함량이 높지 않은 것이 활착에 유리하였는데 비료분이 높은 배양토를 사용할 경우 발근 부위에 염류 농도 장애로 인하여 식물체가 고사하는 경우가 많았다. 이와 같은 염류 농도장애를 회피하기 위하여는 저면관수를 피하고 상부에서 분무형태로 관수하는 것이 활착율이 높았다.

나. 형태적인 비교

multifusion을 이용한 것과 배추 브로콜리 사이의 융합체들은 형태상에서 아주 다양한 변이를 보여주었다. 식물체들은 외관상으로 갖에 가까운 것 배추와 브로콜리의 중간형태를 나타낸 것 완전한 브로콜리의 형태를 나타냈다.

배추와 갖은 결구형이며 브로콜리는 비대 화기를 가지고 있는 가지 없는 긴 줄기형이지만 재분화된 식물체의 결구양상을 관찰하여 보았을 때 비결구형이 있으며 결구시 잎끝의 배열상태는 배추는 바깥쪽으로 굽은 형이며 갖은 포피형이었으며 융합체는 대부분이 비결구 상태를 나타냈다(그림 50-51).

엽형이 브로콜리에 가까운 특성을 지닌 것에서부터 갖에 가까운 것까지 매우 다양하였다. 엽병은 배추와 갖의 넓은 것과는 달리 브로콜리처럼 3원형이나 혹은 중간형이었으며 결각이 있는 엽형태와 그리고 잎이 오글오글하게 주름이 많이 지어 있는 형태들도 관찰되었다. 엽색은 갖처럼 짙은 녹색을 띠는 것도 있으며 브로콜리와 같은 색을 띠는 것도 그리고 그 중간색을 띠는 것으로 다양하였다.



그림 50. 배추, 브로콜리, 갓의 형태비교
상: 배추, 중: 브로콜리, 하: 갓

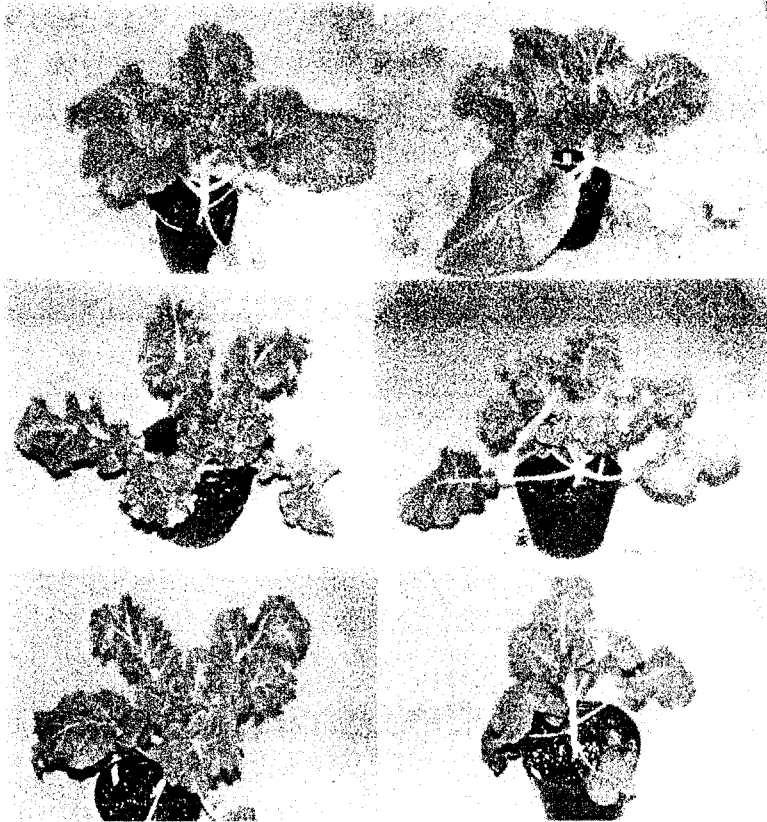


그림 51. Multi-fusion으로 융합된 세포에서 재분화된 식물체들의 다양한 형태

엽형태 뿐만 아니라 모용도 변이가 다양하여 갓에서 유래한 모용이 많은
 에서부터 브로컬리와 같이 모용이 없는 것까지 밀도에 있어서 다양한 변화를
 보였으며 엽면의 납질 또한 다양한 변화를 보였다. 엽형이 갓에 가까운 형태
 를 가진 개체들도 절간 신장과 줄기의 직경으로 보아 브로컬리의 형질이 나
 타나는 것으로 판단되었다. 그러나, 잡종식물체의 맛에 있어서는 갓의 형태
 를 나타내는 개체들이 갓 특유의 풍미를 가지고 있었다(그림 52-53).



그림 52: 세가지 융합재료들의 엽형의 비교
 좌: 브로컬리, 중: 갓, 우: 배추

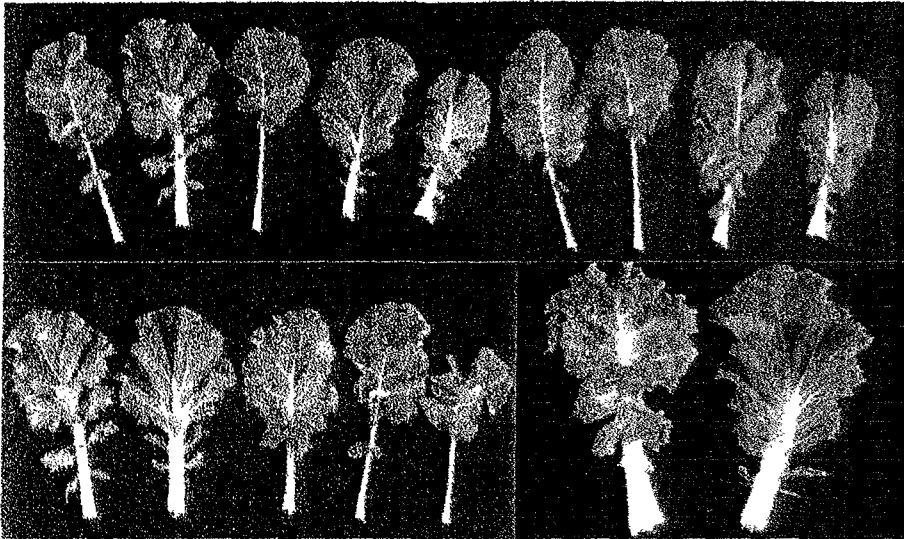


그림 53: 생산된 체세포잡종체들의 다양한 잎의 형태비교

6. 추대성 및 개화습성 비교

체세포장종식물체들은 9월6일에 포트에 순화되어 유리온실에서 재배하였다. 자연적인 조건하에서 식물체들은 2개월이 되어 꽃대가 올라오기 시작하였다. 융합모본들인 배추, 브로콜리, 갓 중에서 브로콜리가 융합체들과 비슷하게 추대되었으나 배추와 갓은 아직도 추대되어 있지 않는 상태로 보아 추대성은 브로콜리와 비슷한 것으로 보인다. 그러나 꽃대가 올라오는 양상은 브로콜리와는 다르게 배추나 갓의 추대모양은 나타내고 있다. 브로콜리의 화기 정단부의 분지양식은 불규칙적으로 작은 꽃 덩이가 뭉쳐진 하나의 촘촘한

화종이지만 재분화된 식물체의 대부분은 끝이 분지되면서 총상화서를 가진 비대줄기이다(그림 54)



그림 54. 체세포잡종체와 브로콜리의 추대, 개화습성 비교

제 4 절 체종체계확립 및 기대효과

갓과 배추 브로콜리의 융합체는 지금 포장에서 재배되고 있는 상태이다. 이들의 형태적인 다양성을 가지고 있기 때문에 융합잡종식물체에 융합에 사용된 재료친을 여교잡 하는 경우 임성이 높지는 않았으나 종자 획득이 가능하였으며 이렇게 얻어진 후대는 여교잡 친의 특성을 많이 발현하여 체세포 융합을 통하여 목적하는 특정 형질을 도입할 수 있는 가능성이 확인되었으며 현재 양성중인 배추 × 갓 × 브로콜리 융합잡종식물체가 개화가 진행되면 융성불임 여부를 판단하여 여교잡에 의한 융성불임 형질의 도입이 가능할 것으로 판단된다.

multifusion 방법을 이용한 체세포잡종식물체의 생산은 두가지 세포를 융합하였을 때보다 핵과 세포질의 유전자의 재조합 확률이 높아지는 만큼 새로운 식물체를 창출하는데 아주 큰 의의가 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- A. Dubereucq. B.Bberthe . J-F. Asset. L. Bouldard. F. Buğar. J.Vasseur. Ramband (1999) Analysis of mitochondrial DNA structure and expression in three cytoplasmic male sterility chicories originating from somatic hybridization between fertile chicory and CMS sunflower protoplasts Theor Appl Genet 99: 1094-1105
- Akagi H, T. Taguchi, and T. Fujimura 1995. Stable inheritance and expression of the CMS traits introduced by asymmetric protoplast fusion. Theor Appl Genet 91: 563-567.
- A.Kanno .H.Kanzaki. T.Kameya(1997) Detailed analysis of chloroplast and mitochondrial DNAs from the hybrid plant generated by asymmetric protoplast fusion between radish and cabbage 16:479-484
- Arumugam N, A. Mukhopadhyay, V. Gupta, D. Pental, and A.K. Pradhan 1996. Synthesis of hexaploid(AABBCC)somatic hybrids: a bridging material for transfer of 'tour' cytoplasmic male sterility to different *Brassica* species. Theor Appl Genet 92:762-768.
- Bannerot H, Bouldard L, Cauderon and Y, Tempe J, 1994. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativa* to *Brassica oleracea*. Proc. Eucarpia meeting Cruciferae P. 52-54.
- Bauer-Weston, B, W Kellr, J.Webb, and S. Gleddie 1993. Production and characterization of asymmetric somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. Theor Appl Genet 86:150-158.
- Caridi. Jarl, Gunnel M, Karlsson, Janet F. Bornman, and Chris H. Bornman 1993. Chloroplast ultrastructure and Male-sterile Radish cytoplasm In vitro cell. Biol 1994. 30P:4-9,
- Cardi T, and E. D. Earle 1997. Production of new CMS *Brassica oleracea* by transfer of 'Anand' cytoplasm from *B.rapa* through protoplast fusion. Theor Appl Genet 94: 204-212.
- Carlson PS, Smith HH and Dearing RD 1972. Parasexual

interspecific plant hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 69: 2292-2294.

Chatterjee G, S.S. Das and S.K. Sen 1988. Intergenic somatic hybrid production through protoplast fusion between *Brassica juncea* and *Diplotaxis muralis*. Theor Appl Genet 76:915-922.

Christey M.C, C.A. Makaroff and E.D. Earle 1991. Atrazine-resistant cytoplasmic male-sterile-nigra broccoli obtained by protoplast fusion between cytoplasmic male-sterile *Brassica oleracea* and atrazine-resistant *Brassica campestris*. Theor Appl Genet 83:201-208.

Douglas W. Heath and Elizabeth D. Earle 1996. Synthesis of Ogura male sterile rapeseed (*Brassica napus L.*) with cold tolerance by protoplast fusion and effects of atrazine resistance on seed yield. Plant cell reports 15:939-944.

E.P.Brewer. J.A.Saunders .J.S.Angle .R.L.Chaney. M.S.McIntosh (1999) Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thilaspia caerulescens* and *Brassica napus* Theor Appl Genet 99:761-771

Fahleson J, Rahlen L and Glimelius K 1988. Analysis of plants regenerated from protoplast fusions between *Brassica napus* and *Eruca sativa*. Theor Appl Genet 76: 507-512.

Forsberg J, Maria Landgren, and Kristina Glimelius 1994. Fertile somatic hybrids Between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Science 95 213-223.

Glimelius K 1988. Potentials of protoplast fusion in plant breeding programmes. In: KJ Puite, JJM Dons, HJ Huizing, AJ Kool M Koornneef and FA Krens (eds) Progress in plant protoplast research, Kluwer Academic Publishers, pp 159-168.

Glimelius.K, Mats Djupsjobacka and Hugo Fellner-Felldegg 1986. Selection and enrichment of plant protoplast heterokaryons of

- Brassicaceae* by flow sorting. *Plant science* 45: 133-141.
- Hagimori M, M.Nagaoka, N.Kato, and H.Yoshikawa 1992.** Production of somatic hybrids between the Japanese radish and cauliflower. *Theor Appl Genet* 84: 819-824.
- Hansen L.N, and E.D.Earle 1995.** Transfer of resistance of *Xanthomonas campestris pv campestris* into *Brassica oleracea* L.by protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 91:1293-1300.
- Hisako, Yamanaka, Yasuhisa, Kuginuki, Tsuguo, Kanno, and Takeshi Nishio 1992.** Efficient production of somatic hybrids between *Paphanus sativus* and *Brassica oleracea*. *Japan. J. Breed* 12:329-339.
- Hoffmann F and Adachi T 1981.** "*Arabidobrassica*": Chromosomal recombination and morphogenesis in asymmetric intergeneric hybrid cells. *Planta* 153: 586-593.
- Jourdan P. S, E.D.Earle and M.A.Mutschler 1989.** Synthesis of male sterile, trazine-resistant *Brassica napus* by somatic hybridization between cytoplasmic male sterile *B.oleracea* and atrazine-resistant *B.campestris*. *Theor Appl Genet* 78:445-455.
- Kao KN and Michayluk 1974.** A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115: 355-367.
- Kaemble R. J, S. A. Yarrow, S.-C.Wuand and T.L.Barsby 1988.** Absence of mitochondrial and chloroplast DNA recombinations in *Brassica napus* plants regenerated from protoplasts, protoplast fusions and anther culture. *Theor Appl Genet* 75:785-881.
- Kong-Nan Zhao, Malcolm I.whiwecross, and Dennies J.Bittsnich 1994.** Studies od plant regeneration from cytopedonary protoplasts in *Brassica campestris*. *Plant Cell Report* 13:164-170.
- Krishnasamy S, Christopher and A. Makaroff 1993.** Characterization of the radish mitochondrial orfB locus:possible relationship with male sterility in Ogura radish. *Curr Genet* 24:156-163.

- Kriti P. B, T. Mohapatra, H. Khanna, S. Prakash, and V.L.Chopra 1995.** *Diplotaxis catholica* + *Brassica juncea* somatic hybrids: molecular and cytogenetic characterization. Plant Cell Report 14:593-597.
- Kumar A, and Cooking E.C 1987.** Protoplast fusion: A novel approach to organelle genetics in higher plants. Am J Bot 74: 1289-1303 In **Ogura H 1968.** Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrids seeds. Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University VI, 2: 39-78.
- Liu Ji-Hong, Christina Dixelius, Ingrid Eriksson, and Kristina Glimeius 1995.** *Brassica nupus*(+)*B.tournefortii*, a somatic hybrid containing trait of agronomic importance for rapeseed breeding. Plant Science 75-86.
- N.Arumugam, A.Mukhopadhyay V.Gupta Y.S.Sodhi. J.K Verma. D.Pental, A.K.Pradhan(2000)** Somatic cell hybridization of *oxy* CMS *Brassica juncea*(AABB) with *B.oleracea*(CC) for correction of chlorosis and transfer of novel organelle combinations of allotetraploid *Brassica*
- Olin-Fatih M 1996.** The morphology, cytology, and C-banded karyotypes of *Brassica campestris*, *B.oleraceas* and *B.nupus* plants regenerated from protoplasts. Theor Appl Genet 93:414-420.
- Pelletier G, C.primard, F.Vedel, P.Chetrit, R.Remy, Rousselle, and M.Renard 1983.** Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. Mol Gen Genet 191:244-250.
- Pelletier G, Férault, D.lancelin, L.Bboulibard, C. Dore', S.Bonhomme, M.Grelon and F.Budar 1995.** Engineering of cytoplasmic male sterility in vegetable by protoplast fusion. Acta Horticulturae. 392: 11-17.
- Rao G. U, Vinita Batra-Sarup, S. Prakash and K. R.Shvanna 1994.** Development of a New Cytoplasmic Male-Sterility System in

Brassica juncea through Wide Hybridization. Plant breeding 112, 171-174.

Robertson D, Palmer JD, Earle ED and Mutschler MA 1987. Analysis of organelle genomes in a somatic hybrid derived from cytoplasmic male-sterile *Brassica oleracea* and atrazine-resistant *B. campestris*. Theor Appl Genet 74: 303-309.

Sacristan M D, Gerdemann-Knorck M and Schieder O 1989. Incorporation of hygromycin resistance in *Brassica nigra* and its transfer to *B. napus* through asymmetric protoplast fusion. Theor Appl Genet 78: 194-200.

Sandrine B. F. Budar, M. Férault, and G. Pelletier 1991. A 2.5 kb NcoI fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in *Brassica* cybrids. Curr Genet 19:121-127.

Schenck H R and G. Röbbelen 1982. Somatic hybrids by fusion of protoplasts from *Brassica oleracea* and *B. campestris*. Z .P flanzentg 89:278-288.

Sigareva M.A, and E.D. Earle 1997. Direct transfer of a cold-tolerant Ogura male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea ssp. capitata*) via protoplast fusion. Theor Appl Genet 94:213-220.

Souza-Machado V S Bandeen J D, Stephen and Lavigne P 1978. Uniparental inheritance of chloroplast atrazine tolerance in *Brassica campestris*. Can J. Plant Sci. 58:966-981.

Sundberg E 1991. Somatic hybrids and cybrids within *Brassica*.

Sundberg E, and Glimelius K 1991. Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae*. Theor Appl Genet 83:81-88

Sundberg E. and Glimelius K 1991. Production of cybrids plants within *Brassicaceae* by fusing protoplasts and plasmolytically induced

cytoplasts. *Plant Science* 79:205-216

Toriyama K, Hinata K and Kameya T 1987. Production of somatic hybrid plants, '*Brassicomoricaandia*', through protoplast fusion between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*. *Plant Science* 48: 123-128.

Toriyama K, Kameya T and Hinata K 1987. Selection of a universal hybridizer in *Sinapis turgida* Del. and regeneration of plantlets from somatic hybrids with *Brassica* species. *Planta* 170: 308-313.

Vedel F, Chertrit P, Mathieu C, Pellertier and G, Primard C 1986. Analysis of the protoplast fusion-induced molecular events responsible for the mitochondrial DNA polymorphism in the rapeseed *Brassica napus* .P.192-210.

Walters TW, Mutschler MA, and Earle ED. 1992. Protoplast fusion derived Ogura male sterile cauliflower with cold tolerance. *Plant Cell Reports* 10:624-628

Yamagishi H, Hiroaki Y. and Susuma Y 1990. Leaf morphology and soft rot resistance in offspring of a somatic hybrid between chinese cabbage and kale(cruciferae). *Euphytica* 47: 215-221

Yamagishi H, Hirai M, Yoshikawa H and Yui S 1989. Production of somatic hybrid between black mustard (*Brassica nigra* Koch.; BB) and Hakuran (*B. napus* L.; AACC). *Jpn. J. Breed.* 39: 229-233.

Yamagishi H. Mohammad-Mofazzal H, and Yonezawa K. 1992. Production and somatic hybrids between southern type chinese cabbage 'Kenshin' and 'Yoshin' and their flowering characteristics. *J. Japan. Soc., Hort. Sci.* 61(2):311-316.

Yamagishi H, T. Terachi 1994. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. I.The origin and distribution of Ogura male-sterile cytoplasm in Japanese wild radishes (*Raphanus sativus* L.) revealed by PCR-aided assay of their mitochondrial DNAs. *Theor Appl Genet* 87: 996-1000.

Yamagishi H, T. Terachi 1986. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae III. Distribution of Ogura-type cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish Cultivars. Theor Appl Genet 93:325-332.

Yamashita Y, R. Terada, S. Nishibayashi and K. Shimamoto 1989. Asymmetric somatic hybrids of *Brassica* : partial transfer of *B.campestris* genome into *B.oleracea* by cell fusion. Theor Appl Genet 189-194.

Yarrow SA, Wu SC, Barsby TL, Kemble RJ and Shepard JF 1986. The introduction of CMS mitochondria to triazine tolerant *Brassica napus* L. var."Regent", by micromanipulation of individual heterokaryons. Plant Cell Reports 5: 415-418.