

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0032198

(43) 공개일자 2025년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 6/20 (2018.01) A01H 4/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01H 6/20 (2022.05)

A01H 4/002 (2024.01)

(21) 출원번호 10-2023-0114691

(22) 출원일자 2023년08월30일

심사청구일자 2024년04월24일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

이상협

서울특별시 성동구 동일로 237, 104동 601호(송정동, 서울숲아이파크)

무하마드 후세인

서울특별시 성동구 동일로55가길 23 (송정동)

(74) 대리인

특허법인리체

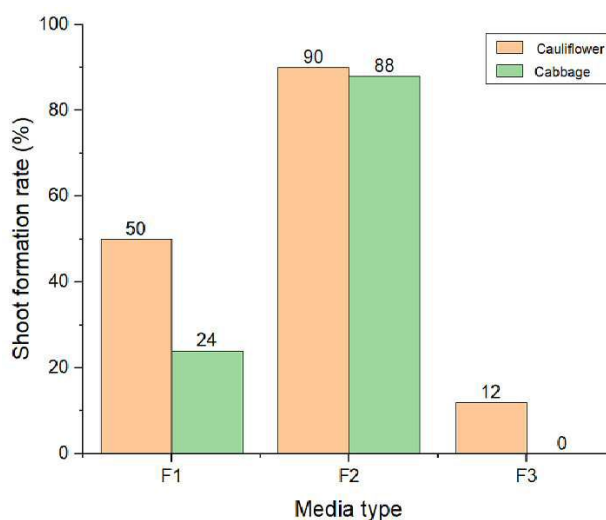
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 십자화과 작물의 재분화 방법

(57) 요약

본 발명은 십자화과 작물의 원형질체 유래 재분화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 재분화 방법을 이용하여 다양한 십자화과 작물을 높은 효율로 재분화할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A01H 4/005 (2013.01)

C12N 5/0025 (2013.01)

C12N 5/04 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395077377
과제번호	RD010039
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발사업
연구과제명	항암성분이 강화된 양배추 · 브로콜리 계통 육성
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

십자화과 작물로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 제1단계;

상기 원형질체에서 캘러스를 유도하는 제2단계; 및

상기 캘러스로부터 싹을 유도하는 제3단계를 포함하고,

상기 제2단계에서 사용되는 B 배지는 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)을 0.25 내지 1.25 mg/L로 포함하고,

상기 제3단계에서 사용되는 F 배지는 나프탈렌아세트산(Naphthalene acetic acid)과 6-벤질아미노퓨린(6-benzylaminopurine)을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 십자화과 작물은 콜리플라워, 양배추, 브로콜리, 케일 또는 콜라비인, 십자화과 작물의 재분화 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제1단계에서 십자화과 작물의 본엽으로부터 원형질체를 분리하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 제2단계의 B 배지는 0.75 내지 1.25 mg/L의 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid), 0.75 내지 1.25 mg/L의 6-벤질아미노퓨린, 0.75 내지 1.25 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제2단계에서 B 배지 이후에, C 배지를 추가로 사용하고,

상기 C 배지는 35 내지 45 g/L의 D-만니톨(D-mannitol), 0.5 내지 1.5 mg/L의 6-벤질아미노퓨린, 0.15 내지 0.25 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 제2단계에서 C 배지 이후에, E 배지를 추가로 사용하고,

상기 E 배지는 0.45 내지 0.55 mg/L의 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid), 0.45 내지 0.55 mg/L의 6-벤질아미노퓨린, 0.15 내지 0.25 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 F 배지에서 나프탈렌아세트산 대비 6-벤질아미노퓨린의 비율이 5 내지 15인, 십자화과 작물의 재분화 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 F 배지는 0.05 내지 0.15 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 F 배지는 0.25 내지 1.25 mg/L의 6-벤질아미노퓨린을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 제3단계에서 F 배지 이후에, R 배지를 추가로 사용하고, 상기 R 배지는 0.05 내지 0.15 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 십자화과 작물(*Brassica* vegetable)의 원형질체 유래 재분화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 십자화과 작물(배추과, Brassicaceae)에는 무, 브로콜리, 애기장대, 겨자, 고추냉이, 콜라비, 양배추, 케일, 콜리플라워 등이 있으며, 십자화과 작물은 항산화 또는 항암 기능성이 뛰어난 물질들을 생산할 수 있다.

[0004] 식물의 재분화(regeneration)는 작물의 게놈(genome) 편집, 형질전환 등 유전공학적 응용에 필수적인 기술로서, 낮은 재분화 효율은 게놈 편집에 있어 주요한 hurdles로 알려져 있다. 고부가가치의 작물을 농생명공학적으로 육종하기 위해서는 게놈 편집 또는 형질전환 후 조직의 탈분화(캘러스 형성, callus formation)와 지상부 재분화(shoot regeneration)가 순차적으로 수행된다. 이때 식물 재분화 과정의 효율을 높이는 것이 작물의 형질개량에 중요한 부분을 차지한다.

[0005] 십자화과 작물의 원형질체(protoplast)에서 미세 캘러스를 거쳐 재분화 식물체를 얻는 재분화 방법에 대해서는 종래에 개시하고 있지만, 기존 방법들로는 같은 십자화과 작물이더라도, 종이 달라지거나 종이 같더라도 genotype이 달라질 경우 재분화 효율이 높지 않은 경우가 많았다. 따라서, 재분화 효율이 높으면서, 십자화과 작물에 공통적으로 적용가능한 재분화 방법이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 2385335호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 십자화과 작물의 재분화 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 1. 십자화과 작물로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 제1단계; 원형질체에서 캘러스를 유도하는 제2단계; 및 캘러스로부터 싹을 유도하는 제3단계를 포함하고, 제2단계에서 사용되는 B 배지는 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)을 0.25 내지 1.25 mg/L로 포함하고, 제3단계에서 사용되는 F 배지는 나프탈렌아세트산(Naphthalene acetic acid)과 6-벤질아미노퓨린(6-benzylaminopurine)을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.
- [0011] 2. 위 1에 있어서, 십자화과 작물은 콜리플라워, 양배추, 브로콜리, 케일 또는 콜라비인, 십자화과 작물의 재분화 방법.
- [0012] 3. 위 1에 있어서, 제1단계에서 십자화과 작물의 본엽으로부터 원형질체를 분리하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.
- [0013] 4. 위 1에 있어서, 제2단계의 B 배지는 0.75 내지 1.25 mg/L의 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid), 0.75 내지 1.25 mg/L의 6-벤질아미노퓨린, 0.75 내지 1.25 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.
- [0014] 5. 위 1에 있어서, 상기 제2단계에서 B 배지 이후에, C 배지를 추가로 사용하고, C 배지는 35 내지 45 g/L의 D-만니톨(D-mannitol), 0.5 내지 1.5 mg/L의 6-벤질아미노퓨린, 0.15 내지 0.25 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.
- [0015] 6. 위 5에 있어서, 제2단계에서 C 배지 이후에, E 배지를 추가로 사용하고, E 배지는 0.45 내지 0.55 mg/L의 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid), 0.45 내지 0.55 mg/L의 6-벤질아미노퓨린, 0.15 내지 0.25 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.
- [0016] 7. 위 1에 있어서, F 배지에서 나프탈렌아세트산 대비 6-벤질아미노퓨린의 비율이 5 내지 15인, 십자화과 작물의 재분화 방법.
- [0017] 8. 위 1에 있어서, F 배지는 0.05 내지 0.15 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.
- [0018] 9. 위 1에 있어서, F 배지는 0.25 내지 1.25 mg/L의 6-벤질아미노퓨린을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.
- [0019] 10. 위 1에 있어서, 제3단계에서 F 배지 이후에, R 배지를 추가로 사용하고, R 배지는 0.05 내지 0.15 mg/L의 나프탈렌아세트산을 포함하는, 십자화과 작물의 재분화 방법.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 재분화 방법은 십자화과 작물에 공통적으로 적용가능한 표준 원형질체 유래의 미세 캘러스 유도 기술을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 재분화 방법은 십자화과 작물에 공통적으로 적용가능한 원형질체 유래 표준 재분화 기술을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 재분화 방법을 이용하면 높은 효율로 십자화과 작물의 재분화가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 원형질체의 생존율을 나타낸 것이다. 박스 플롯은 B 배지에서 PEG 처리 후 다양한 십자화과 작물의 원형질체 생존 비율을 나타내며, x축은 십자화과 작물을 나타내고, y축은 생존한 원형질체 비율을 나타낸다. 데이터

에 대한 분산 분석(ANOVA) 결과, 실험한 십자화과 작물 간의 생존율에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났고, 이들은 하나의 그룹으로 분류되었으며, 박스 플롯에서 그룹 "a"로 표시 되어있다.

도 2는 PEG 처리 후 세포벽 및 세포 분열의 모습이다. (A)는 6시간의 PEG 처리 후 온전한 원형질체를 관찰한 것이고, (B)는 배양 2일 후 세포벽 합성을 관찰한 것이고, (C)는 배양 7일 후 세포 분할을 관찰한 것이다. 눈금막대는 50 마이크로미터(μm)를 나타낸다.

도 3a 내지 3c는 5가지 십자화과 작물(양배추, 콜리플라워, 브로콜리, 케일, 콜라비)에서 PEG 처리 이후 미세 캘러스(마이크로캘러, microcalli) 형성의 효율성을 백분율로 표시한 것이다. x축은 십자화과 작물, y축은 효율 백분율(percentage efficiency)을 나타낸다. 도 3a는 B1 배지에서의 결과, 도 3b는 B2 배지에서의 결과, 도 3c는 B3 배지에서의 결과를 나타낸다. 표준 오차는 데이터의 변동성을 나타내기 위해 차트에 표시되었다. 분산 분석(ANOVA) 결과는 차트 위에 알파벳 문자로 표시되었다. 두 막대가 같은 글자를 공유하면 두 막대 간에 유의미한 차이가 없음을 의미한다.

도 4는 원형질체에서 마이크로캘러까지 다양한 발달 단계를 나타낸 것이다. x축은 2세포, 4세포, 8/16 세포, 마이크로캘러 형성 단계 등 다양한 형태적 변화 단계를 나타내었다. y축은 5가지 십자화과 작물(콜리플라워, 양배추, 브로콜리, 케일, 콜라비)를 나타낸다. 단일세포, 2세포, 4세포 및 8/16 세포 단계에 해당하는 이미지의 경우 눈금 막대가 50 마이크로미터인 반면, 마이크로캘러에 해당하는 이미지의 경우 눈금 막대가 1 센티미터(cm)로 조정되어 있다.

도 5는 싹 유도배지의 종류(F1, F2, F3)에 따른 콜리플라워와 양배추의 싹 형성(shoot formation)의 효율을 나타낸다. x축은 실험에 사용된 싹 유도 배지(F1, F2, F3)를 나타내고, y축은 콜리플라워와 양배추의 캘러스에서 싹이 출현한 비율을 나타내었다. 각 막대 그래프는 특정 유형의 싹 유도 배지에 대한 싹 출현 비율을 나타내며, 각 막대의 백분율 값은 막대 그래프 상단에 표시되어 있다.

도 6은 원형질체에서 재분화 식물에 이르는 모든 절차를 나타낸 것이다. (a)는 양배추, (b)는 콜리플라워의 재분화이다. 검은색 눈금막대는 50 μm 의 길이를 나타내고, 빨간색 눈금막대는 1 cm의 길이를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은 십자화과 작물의 재분화 방법에 관한 것으로, 십자화과 작물로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 제1단계; 원형질체에서 캘러스를 유도하는 제2단계; 및 캘러스로부터 싹을 유도하는 제3단계를 포함하고, 제2단계에서 사용되는 B 배지는 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)을 0.25 내지 1.25 mg/L로 포함하고, 제3단계에서 사용되는 F 배지는 나프탈렌아세트산(Naphthalene acetic acid)과 6-벤질아미노퓨린(6-benzylaminopurine)을 포함한다.
- [0027] 십자화과 작물은 배추과 또는 Brassicaceae의 작물로, 예를 들어, 콜리플라워, 양배추, 브로콜리, 케일, 콜리플라워, 무, 배추, 애기장대, 겨자, 고추냉이 등이 있다. 바람직하게는, 콜리플라워, 양배추, 브로콜리, 케일, 콜리플라워일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 제1단계는 십자화과 작물로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 단계이다.
- [0029] 원형질체는 세포벽이 제거된 상태의 세포이다. 원형질체는 십자화과 작물의 잎, 뿌리, 줄기 등 모든 부위로부터 분리될 수 있다. 바람직하게는 십자화과 작물의 자엽(cotyledon) 또는 본엽(true leaf)으로부터 분리할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 3~4번째의 본엽으로부터 분리할 수 있다. 일 실시예에서, 원형질체의 분리는 표 2의 조성의 분리액을 사용하였다. 위 분리액을 사용할 경우, 브로콜리, 양배추, 콜리플라워, 케일, 콜라비 모두에서 높은 원형질체 분리 효율을 확인할 수 있었다(도 1).
- [0030] 제2단계는 원형질체에서 캘러스를 유도하는 단계이다.
- [0031] 제2단계에서는 원형질체의 배양 배지로 B 배지, C 배지, E 배지가 순서대로 사용될 수 있다.
- [0032] B 배지는 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid, 2,4-D)을 0.25 내지 1.25 mg/L, 0.5 내지 1.25 mg/L, 0.6 내지 1.25 mg/L, 0.7 내지 1.25 mg/L, 0.75 내지 1.25 mg/L, 0.8 내지 1.2 mg/L, 0.85 내지 1.2 mg/L, 0.85 내지 1.15 mg/L, 0.9 내지 1.15 mg/L, 0.9 내지 1.1 mg/L, 0.95 내지 1.05 mg/L로 포함할 수 있다.
- [0033] B 배지는 6-벤질아미노퓨린(BAP)을 0.75 내지 1.25 mg/L, 0.8 내지 1.2 mg/L, 0.85 내지 1.15 mg/L, 0.9 내지 1.1 mg/L 또는 0.95 내지 1.05 mg/L로 포함할 수 있고, 나프탈렌아세트산(NAA)을 0.75 내지 1.25 mg/L, 0.8 내지 1.2 mg/L 또는 0.85 내지 1.15 mg/L로 포함할 수 있다.

지 1.2 mg/L, 0.85 내지 1.15 mg/L, 0.9 내지 1.1 mg/L 또는 0.95 내지 1.05 mg/L로 포함할 수 있다. 일 실시예에서, Full B5 vitamins, 2% 포도당, 70 g/L D-만니톨, 1 mg/L의 6-벤질아미노퓨린(BAP), 1 mg/L의 나프탈렌아세트산(NAA), 1 mg/L의 2,4-D를 포함하는 B1 배지에서 가장 높은 원형질체 형성 효율을 확인하였다(도 3a 내지 3c).

[0034] 제2단계는 원형질체를 B 배지에서 배양한 이후에, C 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다. C 배지는 D-만니톨을 35 내지 45 g/L, 36 내지 44 g/L, 37 내지 43 g/L, 38 내지 42 g/L 또는 39 내지 41 g/L로 포함할 수 있고, BAP를 0.5 내지 1.5 mg/L, 0.6 내지 1.4 mg/L, 0.7 내지 1.3 mg/L, 0.8 내지 1.2 mg/L 또는 0.9 내지 1.1 mg/L로 포함할 수 있고, NAA를 0.5 내지 1.5 mg/L, 0.6 내지 1.4 mg/L, 0.7 내지 1.3 mg/L, 0.8 내지 1.2 mg/L 또는 0.9 내지 1.1 mg/L로 포함할 수 있다.

[0035] 제2단계는 C 배지에서 배양한 이후에 E 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다. E 배지는 2,4-D를 0.45 내지 0.55 mg/L, 0.46 내지 0.54 mg/L, 0.47 내지 0.53 mg/L, 0.48 내지 0.52 mg/L 또는 0.49 내지 0.51 mg/L로 포함할 수 있고, BAP를 0.45 내지 0.55 mg/L, 0.46 내지 0.54 mg/L, 0.47 내지 0.53 mg/L, 0.48 내지 0.52 mg/L 또는 0.49 내지 0.51 mg/L로 포함할 수 있고, NAA를 0.15 내지 0.25 mg/L, 0.16 내지 0.24 mg/L, 0.17 내지 0.23 mg/L, 0.18 내지 0.22 mg/L 또는 0.19 내지 0.21 mg/L로 포함할 수 있다.

[0036] B 배지, C 배지, E 배지의 pH는 pH 5.3 내지 6.3, pH 5.4 내지 6.2, pH 5.5 내지 6.1, pH 5.6 내지 6.0 또는 pH 5.7 내지 5.9일 수 있다.

[0037] 제3단계는 캘러스로부터 싹을 유도하여, 재분화 식물체를 유도하는 단계이다.

[0038] 제3단계에서는 캘러스 배양 배지로 F 배지(싹 유도 배지), R 배지(뿌리 발달 배지)가 순서대로 사용될 수 있다.

[0039] E 배지에서 유도된 미세 캘러스(마이크로캘러스)를 암주지에서 계대 배양하여 흰색의 캘러스가 녹색의 캘러스로 변화하면 F 배지에 옮겨 싹이 유도될 때까지 배양할 수 있다. 배양은 2주 간격의 계대 배양일 수 있다.

[0040] F 배지는 나프탈렌아세트산(Naphthalene acetic acid, NAA)과 6-벤질아미노퓨린(6-benzylaminopurine, BAP)을 포함한다. F 배지는 NAA 대비 BAP의 비율이 5 내지 15, 6 내지 14, 7 내지 13, 8 내지 12 또는 9 내지 11일 수 있다.

[0041] F 배지는 NAA를 0.05 내지 0.15 mg/L, 0.06 내지 0.14 mg/L, 0.07 내지 0.13 mg/L, 0.08 내지 0.12 mg/L 또는 0.09 내지 0.11 mg/L로 포함할 수 있다.

[0042] F 배지는 BAP를 0.25 내지 1.25 mg/L, 0.3 내지 1.2 mg/L, 0.35 내지 1.15 mg/L, 0.4 내지 1.1 mg/L, 0.45 내지 1.05 mg/L, 0.5 내지 1.05 mg/L, 0.6 내지 1.05 mg/L, 0.7 내지 1.05 mg/L, 0.8 내지 1.05 mg/L 또는 0.9 내지 1.05 mg/L로 포함할 수 있다.

[0043] 제3단계는 캘러스를 B 배지에서 배양하여 싹을 유도한 다음에, 이를 R 배지에 배양하여 뿌리를 발달시키는 단계를 포함할 수 있다. R 배지는 NAA를 0.05 내지 0.15 mg/L, 0.06 내지 0.14 mg/L, 0.07 내지 0.13 mg/L, 0.08 내지 0.12 mg/L 또는 0.09 내지 0.11 mg/L로 포함할 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0047] 실시예 1: 재료 및 방법

[0048] 1-1. 식물 재료

[0049] 콜리플라워(*Brassica oleracea* var. *botrytis*) 품종 'Serak', 양배추(*Brassica oleracea* var. *capitata*) 품종 'Kokoma', 브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*) 품종 'Kingdom', 케일(*Brassica oleracea* var. *acephala*) 품종 'Jeloojone', 콜라비(*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) 품종 'Greencall'은 아시아 종묘(인천, 경기도, 대한민국)에서 공급되었다. 모든 싹은 70 % 에탄올로 5분간 소독한 후 20% 표백제(시판 유한 클로락스, 1.2% 차아염소산나트륨)로 10분간 소독한 후 증류수로 4~5회 세척하였다. 싹은 1/2 비타민과 1/2 MS 배지(Murashige and Skoog media, 네덜란드 하를렘의 Duchefa Biochemie)가 포함된 페트리접시에서 발아하고, 2% 설탕과 0.6%의 한천(pH 5.6)을 보충하였다. 파종 7일 후, 모종을 동일한 배지와 함께 72 X 72 X 100 mm 마젠타 박스(비전 랩 사이언스, 인천, 한국)에 옮겼다. 이식된 모종은 생장상(대한과학사, 강원도, 대한민국)에서

원형질체 분리까지 25 ℃에서 16시간/8시간 명암 조건과 60%의 상대습도 조건에서 배양했다.

1-2. 원형질체 분리

원형질체는 콜리플라워, 양배추, 브로콜리, 케일, 콜라비 모종의 3번째 및 4번째 본엽과 자엽에서 이전에 보고된 연구방법에 약간의 수정을 가하여 분리했다(표 2). 원형질체 분리에 사용된 분리액(isolation solution)은 표 1에 나와있다. 25 개의 본엽과 자엽의 얇은 스트립(strip)(0.5-1 mm)을 가로로 잘라서 10 mL의 효소 용액에 담가 준비하였다. 슬라이스한 샘플을 어두운 조건에서 12 내지 16 시간 배양하고, orbital shaker(제오테크 컴퍼니, 대전, 대한민국)을 사용하여 40 내지 50 rpm으로 천천히 진동시켰다. 배양 후, 원형질체를 100 μm 필터(대진과학사, 강원도, 대한민국)를 사용하여 여과했다. 분리된 원형질체를 50 mL 튜브(미국 애리조나주 글렌데일, Corning)에 수집하고 10 mL의 세척액(W5)을 추가하였다. 그런 다음 튜브를 70 xg에서 5분간 원심분리했다(Labogene, 경기도, 대한민국). 원심분리 후 상층액을 제거하고 원형질체 펠릿(pellet)에 5mL의 W5 용액을 첨가하였다. 원형질체 펠릿을 W5 용액과 잘 혼합한 후 21% 자당 용액 5 mL가 들어있는 14 mL 원형 바닥 튜브(Thermo Fisher Scientific, 미국 매사추세츠주 월섬)로 옮겼다. 그 튜브를 95 xg에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 중간층을 수집하여 바닥이 둥근 14 mL 튜브(Thermo Fisher Scientific)에 넣었다. 다음, W5 용액을 5 mL 추가하고, 70 xg에서 5분간 원심분리했다. 원심분리 후, 상층액을 제거하고 MMG 용액 1 mL를 추가했다. 마지막으로, 분리된 원형질체는 혈구 세포 계수기(Weber Scientific, 미국 뉴저지 주 해밀턴)를 사용하여 Zeiss Prinosstar 3 광학 현미경(Zeiss, 오버코헨, 독일)에서 계수했다. 모든 용액(solution)의 구성은 표 1과 같다.

표 1

Enzyme solution	Composition	1.5% cellulose R-10, 0.4% Macerozyme R-10, 400 mM Mannitol, 8 mM CaCl ₂ 2H ₂ O, 5 mM MES, 5 mM KOH, 0.1% BSA
	pH	5.6
	Sterilization	Filtering(0.2 μm syringe filter)
W5 solution	Composition	154 mM NaCl, 125 mM CaCl ₂ 2H ₂ O, 5 mM KCl, 5 mM Glucose, 1.5 mM MES, 1.5 mM KOH
	pH	5.6
	Sterilization	Autoclave
MMG solution	Composition	400 mM Mannitol, 5 mM MES, 5 mM KOH, 15 mM MgCl ₂
	pH	5.6
	Sterilization	Autoclave
PEG solution	Composition	400 mM Mannitol, 100 mM CaCl ₂ 2H ₂ O, 40 % PEG-4000
	pH	5.6
	Sterilization	Filtering(0.2 μm syringe filter)
Sucrose solution	Composition	21% sucrose
	pH	5.6
	Sterilization	Autoclave

표 2

Original protocol	Composition of solution	The solution used in this study
Yoo et al., 2007	20mM MES, 1.5% cellulase R-10, 0.4% macerozyme R-10, 0.4M mannitol, 20mM KCl	1.5% cellulose R-10, 0.4% macerozyme R-10, 400mM Mannitol, 0.1% BSA
	Warming at 55℃ for 10min, then cool down at room temperature and then add	Dissolve, adjust pH 5.6 and then add
	10 mM CaCl ₂ , 1-5mM beta-mercaptoethanol and	8mM CaCl ₂ 2H ₂ O, 5mM MES, 5mM KOH
	0.1% BSA	Then adjust pH 5.6
	Then adjust pH 5.7	

Kim et al., 2022	1.5% cellulase R-10, 0.4% macerozyme R-10, 400 mM mannitol, 0.1% BSA, 8mM CaCl ₂ , 5mM MES, pH 5.6	1.5% cellulose R-10, 0.4% macerozyme R-10, 400mM mannitol, 0.1% BSA Dissolve, adjust pH 5.6 and then add 8mM CaCl ₂ 2H ₂ O, 5 mM MES, 5 mM KOH
------------------	---	--

1-3. 원형질체에 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 처리

원형질체를 성공적으로 변형하려면 원형질체에 DNA를 도입하는 효과적인 방법이 필요하다. 본 연구에서는 삼투압과 pH를 조절하여 외부 DNA를 원형질체에 도입하기 위해 PEG 처리와 MMG 용액을 활용했다. PEG(4000 g/mol) 처리의 경우, 1×10^6 원형질체를 1 ml의 MMG 용액에 재현탁했다. 다음으로, 원형질체 210 μ l를 채취하여 200 μ l PEG 용액에 다시 현탁시킨 후 부드럽게 혼합하였다. 그 용액을 어두운 조건으로 25℃에서 30분간 배양하였다. 배양 후, W5 용액 1 ml를 첨가하고 용액을 부드럽게 혼합한 후 50 xg에서 5분간 원심분리했다. 상층액을 제거하고 혼합하기 전에 W5 용액 1 ml를 추가했다. 사용된 모든 용액(solution)은 표 1에 나와있다.

1-4. 원형질체 배양

십자화과 작물의 microcalli 형성을 위한 최적의 조건을 확인하기 위하여 실제 잎에서 유래한 원형질체를 배양에 B, C, 및 E 배지를 사용하였다. B 배지에서는 B5 비타민이 미량 영양소(micronutrients)와 다량 영양소(macronutrients)를 대체하고, Tween 80은 첨가하지 않았으며, 다양한 농도의 2,4-D(0.01 mg/L에서 1 mg/L까지)를 첨가했다. C 배지에서는 1/2 비타민 B5가 하위 성분의 미량 영양소 및 다량 영양소를 대체했다. PEG 처리된 원형질체를 다양한 농도의 2,4-D를 함유한 B1 내지 B6 배지의 웰당 1.2 ml 부피의 6 well plate(SPL 생명과학, 경기도, 한국)에 현탁했다. 플레이트(배양접시)는 25℃의 어두운 조건에서 생장상(BioFree, 경기도, 대한민국)에서 15일 동안 배양되었다. 세포분열을 유지하기 위해 7일째와 11일째에 C 배지를 추가하였다. 그런 다음 플레이트를 15일 동안 빛이 있는 상태로 옮겼다. 원형질체의 생존력과 세포 분열 상태를 확인하기 위해 역현미경(Leica DMI8, 베를린, 독일)을 사용하여 매일 모니터링 했다. 콜로니는 녹색을 띠는 작은 별 모양(microcalli)으로 3주 후 육안으로 쉽게 관찰할 수 있었다. 이 연구에 사용된 모든 원형질체 배양배지는 표 3과 같다.

표 3

배지	조성	2,4-D 농도	pH
B1	Full B5 vitamins, 2% glucose, 70 g/L D-mannitol, 1 mg/L BAP, 1 mg/L NAA	1 mg/L	5.8
B2		0.5 mg/L	
B3		0.25 mg/L	
B4		0.1 mg/L	
B5		0.025 mg/L	
B6		0.01 mg/L	
C	1/2 B5 vitamins, 2% glucose, 40 g/L D-mannitol, 1 mg/L BAP, 0.2 mg/L NAA		
E	1/2 MS vitamins, 3% sucrose, 0.5 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP, 0.4 % agar		

1-5. 묘목(plantlet) 재분화

액체 배양의 microcalli를 한천 고형화 캘러스 유도 배지 E에서 계대배양(subculture)하였다(표 3). 이 배양에서는 23℃에서 16시간의 빛($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/8 시간의 어둠 조건이 유지되었다. 증식 및 캘러스 유도를 위해 microcalli를 정기적으로(2주 간격으로) 새로 만든 액체 배지 E에 옮기고 직경이 1 내지 2 cm가 될 때까지 유지했다. Calli의 증식 및 조직형성(organogenesis)을 위해 8 가지의 다른 유형의 F 배지(shooting 배지, 싹 유도 배지)로 옮겨졌다. 모든 F 배지는 다양한 종류의 식물 호르몬의 다양한 조합으로 만들어졌다. 본 연구에 사용된 F 배지에 대한 내용은 표 4와 같다. 싹 유도를 위해 16시간/8시간의 빛($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/어둠 조건과 25℃의 온도를 유지했다. 캘러스는 싹 유도가 나타날 때까지 정기적으로(2주 간격으로) 새로 만든 F 배지에 옮겨졌다. 새싹이 나타난 후, 출현 한 새싹을 동일한 F 배지에서 계대배양하고, 정기적으로(2주 간격으로) 새로 만든 F 배지로 옮겼다. 그런 다음 완전히 자란 새싹을 뿌리 형성 배지(R 배지)로 옮겼다. 증식된 뿌리를 얻기 위해 새로 만든 R 배지에 정기적으로(2주 간격으로) 옮겨 심었다. 뿌리가 잘 내린 식물을 토양 화분(토양: 펄라이트,

10:1)에 옮겨 성장상(대한과학사, 강원도)에서 16시간/8시간 명암 조건과 상대습도 60 %, 25 ℃에서 2주 동안 보관했다. 그런 다음 재생된 식물을 투명 컵으로 덮어 습도를 유지한 후 유리온실(세종대학교, 서울)로 옮겼다. 옮긴 후, 식물이 외부 환경에 익숙해지도록 투명 컵을 10일 동안 서서히 제거했다. 조직형성에 사용된 배지에 대한 정보는 표 4와 같다.

표 4

배지(medium)	조성(composition)	pH	용도(usage)
F1	Full MS vitamins, 3% sucrose, 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP, 0.8 % agar	5.8	싹 유도(shoot inducing)
F2	Full MS vitamins, 3% sucrose, 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L BAP, 0.8 % agar	5.8	싹 유도
F3	Full MS vitamins, 3% sucrose, 0.01 mg/L NAA, 2 mg/L BAP, 0.8 % agar	5.8	싹 유도
F4	Full MS vitamins, 3% sucrose, 0.1 mg/L NAA, 3 mg/L BAP, 0.8 % agar	5.8	싹 유도
F5	Full MS vitamins, 3% sucrose, 0.025 mg/L NAA, 3 mg/L BAP, 0.8 % agar	5.8	싹 유도
F6	Full MS vitamins, 3% sucrose, 0.01 mg/L NAA, 3 mg/L TDZ, 0.8 % agar	5.8	싹 유도
F7	Full MS vitamins, 3% sucrose, 0.01 mg/L IAA, 3 mg/L TDZ, 0.8 % agar	5.8	싹 유도
R	1/2 MS, sucrose(2%), NAA(0.1mg/L), agar(0.8%)	5.8	뿌리 유도(root induction)

1-6. 원형질체 및 microcalli 형성 개수 계산

40배 대물렌즈와 10배 접안렌즈를 장착한 Leica DMi8 도립 현미경(Leica, 베를린, 독일)을 사용하여 원형질체의 수와 microcalli 형성의 효율을 관찰하였다. 원형질체와 microcalli의 현미경 이미지를 캡처하고 이미지 파일을 ImageJ로 가져왔다. 원형질체를 둘러싸고 분석기 도구(analyzer tool)의 "측정(measure)" 도구를 사용하여 기본 파라미터(default parameters)를 사용하여 측정했다. Microcalli의 형성 효율을 측정하기 위해 microcalli의 피복 면적(covering area)를 사용하였다. Microcalli의 이미지를 ImageJ로 가져와 8 비트 디지털 이미지로 변환했다. 그런 다음, microcalli 영역이 없는 부분을 배경으로 지정하였다. 기본 파라미터를 사용하여 "파티클 분석(analyze the particle)" 툴을 적용하여 전체 면적에서 배경 면적을 뺐다.

1-7. 통계분석

본 연구에서, 모든 측정값을 최소 3개의 생물학적 샘플에서 계산하였다. 본 연구에서 사용된 다양한 배지 간의 차이를 식별하기 위해, 모든 통계 분석은 MATLAB(R2020a, The MathWorks, Natick, MA, 미국)을 사용하여 수행되었다. 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정되었다.

실시예 2: PEG 처리된 원형질체의 원형질체 분리 효율 및 생존율 분석

십자화과 작물에 대한 표준화된 원형질체 분리 프로토콜을 개발하기 위해, 논문을 기반으로 변형한 원형질체 분리 용액을 사용하였다(표 2). 먼저, 원형질체 분리에 적합한 조직을 파악하기 위해 콜리플라워, 양배추, 브로콜리, 케일, 콜라비의 묘목(10일령의 Seedling)의 3~4번째 본엽과 자엽 사이의 원형질체 분리 효율을 비교하였다. 실험 결과에 따르면 본엽에서 분리한 원형질체의 밀도는 $7.5 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ fresh weight(FW) (콜리플라워), $7.0 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ FW (양배추), $9.1 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ FW (브로콜리), $7.6 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ FW (케일), $5.5 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ FW (콜라비)였다(표 5). 자엽에서도 비슷한 경향이 관찰되었다: $4.2 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ FW (콜리플라워), $4.3 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ FW (양배추), $4.6 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ FW

(브로콜리), $4 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ (케일), and $3.8 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ (콜라비)(표 5). 실험 결과에 따르면, 분리된 원형질체의 평균 밀도는 십자화과 작물에서 $6.23 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ 였다.

[0069] 다음으로, 본엽과 자엽에서 분리된 원형질체의 밀도를 비교하였다. 본엽은 자엽에 비해 분리된 원형질체의 수가 증가된 것으로 나타났다. 자엽과 본엽에서 분리된 원형질체의 평균 개수는 각각 $4.2 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$, $7.3 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ 였다. 분리된 모든 십자화과 작물에서 본엽에서 유래한 원형질체의 밀도가 높은 것으로 관찰되었다. 분석된 십자화과 작물 간에도 유사한 방식으로 비교하였다. 그 결과 브로콜리의 밀도가 가장 높았고($6.9 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$), 콜리플라워와 케일($5.9 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$), 양배추($5.7 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$), 콜라비($4.7 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) 순으로 나타났다(표 5). 결과적으로, 원형질체 분리에 3~4번째 본엽을 사용한 경우 자엽에 비해 원형질체의 밀도가 1.7배 증가한 것을 확인하였다.

표 5

[0070]

식물	조직 유형 (Tissue type)	원형질체 개수 (No. of protoplast)	원형질체의 평균 수 (Average No. of protoplast)
콜리플라워	자엽(Cotyledon)	$4.2 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$	$5.9 \times 10^6 \pm 0.7 \times 10^6$
	본엽 (True leaf, 3~4번째)	$7.5 \times 10^6 \pm 0.5 \times 10^6$	
양배추	자엽(Cotyledon)	$4.3 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$	$5.3 \times 10^6 \pm 0.7 \times 10^6$
	본엽 (True leaf, 3~4번째)	$7.0 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6$	
브로콜리	자엽(Cotyledon)	$4.6 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$	$6.9 \times 10^6 \pm 0.6 \times 10^6$
	본엽 (True leaf, 3~4번째)	$9.1 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6$	
케일	자엽(Cotyledon)	$4.1 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$	$5.9 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$
	본엽 (True leaf, 3~4번째)	$7.6 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$	
콜라비	자엽(Cotyledon)	$3.8 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$	$4.7 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6$
	본엽 (True leaf, 3~4번째)	$5.5 \times 10^6 \pm 0.5 \times 10^6$	

[0071]

실시예 3: PEG 처리된 원형질체

[0072]

본 연구에서는 본엽에서 유래한 원형질체를 사용하였다. 세포 생존 효율(the efficiency of cell survival)을 측정하기 위해 원형질체를 40% PEG 용액에 30분간 배양하고 B1 배지에서 배양했다. 이 프로토콜에 따라 분석된 십자화과 작물의 평균 생존율은 PEG 처리 원형질체의 85 %였다. 세부적으로는 양배추가 90 %로 가장 높은 생존율을 보였으며, 콜리플라워(87%), 브로콜리(85%), 케일(83%), 콜라비(80%)가 그 뒤를 이었다(도 1).

[0074]

실시예 4: microcalli 형성 및 효율성 분석

[0075]

십자화과 작물의 microcalli(마이크로칼리) 형성을 위한 최적의 조건을 확인하기 위하여, 본엽에서 유래한 원형질체를 배양하기 위해 B, C 및 E 배지를 사용하였다. 본 연구에서는 사용한 C 배지, E 배지의 경우 기존의 알려진 배지를 사용하였다. 다만, 마이크로칼리 형성의 효율성을 측정하기 위해 6가지 유형의 B 배지를 사용하였다.

[0076]

원형질체의 첫 번째 형태학적 변화는 세포벽의 형성과 세포 분열이다(도 2). 이 단계에서 원형질체는 매우 연약하고 배양 조건에 민감하다. B 배지는 세포벽 합성과 세포 분열을 촉진하는데 중요하기 때문에 본 연구에서는 B 배지에 주목하여, 6 종류의 B 배지(B1~B6)를 사용했다(표 3). 6 가지 농도의 2,4-D(1 mg L^{-1} , 0.5 mg L^{-1} , 0.25 mg L^{-1} , 0.1 mg L^{-1} , 0.025 mg L^{-1} , 0.01 mg L^{-1})를 공통 염기성 조성으로 적용하였다(표 3). 결과에 따르면, 상대적으로 낮은 농도의 2,4-D(0.1 mg L^{-1} , 0.025 mg L^{-1} , 0.01 mg L^{-1})(B4~B6)는 마이크로칼리 형성에 실패한 것

으로 나타났다. 그러나, 고농도의 2,4-D(1 mg L^{-1} , 0.5 mg L^{-1} , 0.25 mg L^{-1})(B1-B3)는 각각 다른 효율로 마이크로칼리 형성에 성공했다. 세 가지 배지 중 B1 배지가 가장 높은 마이크로칼리 형성 효율을 보였다(도 3). 양배추, 콜리플라워, 브로콜리, 케일, 콜라비의 B1 배지에서 마이크로칼리 형성 효율은 각각 88%, 90%, 85%, 75%, 70%였다(도 3). 두 번째 및 세 번째 마이크로칼리 형성 효율은 각각 B2 및 B3 배지에서 관찰되었다(도 3). 케일과 콜라비에 대해서는 마이크로칼리 형성을 위한 최적화된 프로토콜이 본 연구에서 처음 확립되었으며, 5 종의 십자화과 작물에서 70 % 내지 90%에 이르는 상당한 마이크로칼리 발생을 확인하였다.

[0077] 이후, 삼투압은 원형질체 배양의 초기 단계에서 세포벽 형성을 위해 중요한 바, 배양 후 7일과 11일에 정기적으로 C 배지를 첨가하였다. 두 달 후, 액체 배양에서 마이크로칼리를 관찰한 다음 고체 E 배지로 옮겼다. 원형질체에서 마이크로칼리까지의 모든 절차는 도 4와 같다.

[0079] 실시예 5: 양배추와 콜리플라워의 원형질체 유래 재분화(protoplast-based regeneration)

[0080] 본 연구에서 십자화과 작물의 마이크로칼리 형성을 위한 최적의 조건을 확인했다. 양배추와 콜리플라워라는 두 가지 십자화과 작물 종을 사용하여, 원형질체 유래 재분화를 위한 최적화된 프로토콜을 완성하였다. 이러한 최적화된 마이크로칼리 형성 프로토콜을 적용하여 양배추와 콜리플라워의 본엽 유래 원형질체의 액체 배양에서 콜로니를 성공적으로 수확했다. 그런 다음, 고체 E 배지에 마이크로칼리 클러스터를 배양하여 캘러스(callus)를 유도했다. 양배추와 콜리플라워 모두에서 콜로니를 배양한지 한 달이 지난 뒤, 캘러스 형성을 성공적으로 유도했다.

[0081] 싹 유도(shoot induction)을 위해서는 사이토키닌 대 옥신의 비율은 종과 유전자형에 따라 다르므로 최적화가 필요하다. 따라서 본 발명자들은 옥신과 사이토키닌 유도체의 종류와 구성에 초점을 맞췄다. 본 연구에서는 옥신 유도체로 인돌 아세트산(indole acetic acid, IAA)와 NAA를, 사이토키닌 유도체로 BAP와 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazol-5-yl) urea (TDZ)를 사용하였다. 싹 유도 배지의 호르몬 구성과 농도는 본 발명에 사용된 F 배지로 표 4에 나와있다. 싹 유도 효율을 측정하기 위해 100개의 calli를 사용하였다.

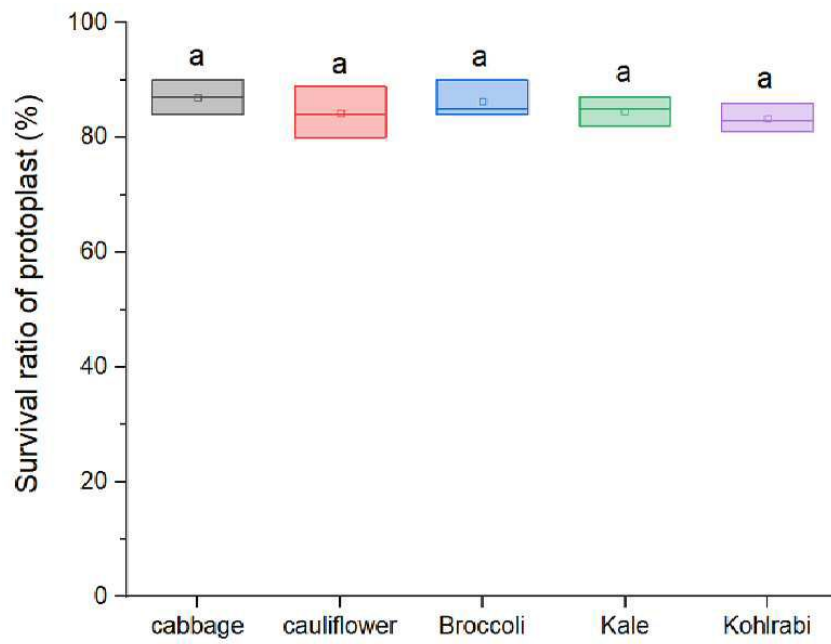
[0082] 콜리플라워에서 F2, F1, F3 배지는 각각 90%, 50%, 12%의 싹 형성율(shoot appearance)을 보였다(도 5). 그러나, 나머지 배지(F4~F7)는 콜리플라워 싹 형성을 유도하지 못했다. 양배추에서도 마찬가지로 F1 및 F2 배지에서 각각 24%, 88%의 싹 형성이 유도되었다(도 5). 그러나 F3 배지는 양배추에서 싹을 유도할 수 없었고(도 5), F4 내지 F7 배지도 마찬가지였다. 요약하면, 우리의 연구 결과는 F1 및 F2 배지가 양배추와 콜리플라워의 싹을 유도하는 데 효과적이라는 것을 시사한다. 특히, 성공적인 싹 유도를 위해서는 최소 0.1 mg L^{-1} 의 NAA 농도가 필요하다는 사실을 발견했다. 또한, 본 연구 결과에 따르면 BAP는 TDZ 보다 더 효과적인 사이토키닌이었으며, 1 또는 2 mg L^{-1} 미만의 농도로도 최적의 싹 유도를 달성하기에 충분했다.

[0083] 사이토키닌/옥신의 높은 비율이 싹 싹 유도에 양성 반응을 보인다는 기존 연구는 본 연구결과와 일치하지 않았다. F1~F3 배지와 F4~F6 배지를 비교한 결과, F4~F6 배지는 사이토키닌/옥신 비율이 더 높았음에도 불구하고 싹 유도에 실패하였다. F1~F3 배지 중 F1은 사이토키닌/옥신 비율이 가장 낮은 반면, 가장 높은 싹 유도율을 보였다(표 4). 그러나 F1 배지는 F2 배지의 10:1(사이토키닌:옥신) 비율보다 낮더라도 높은 사이토키닌/옥신 비율(5:1)을 포함한다. 이는 양배추와 콜리플라워의 싹 유도를 위해서 사이토키닌/옥신(NAA/BAP)의 균형잡힌 비율(well-balanced ratio)을 적용할 수 있음을 보여준다.

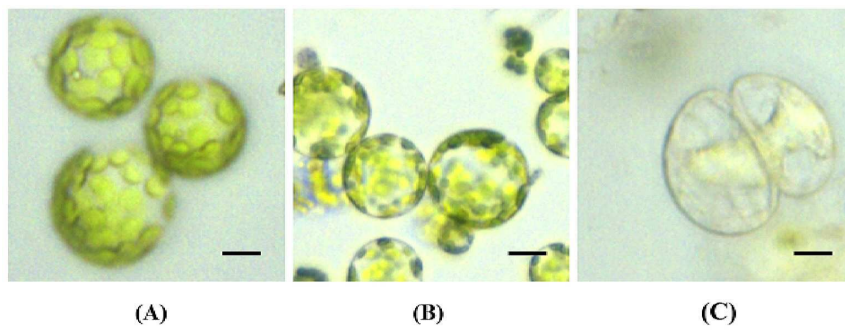
[0084] 싹이 나타난 후, 이를 뿌리 배지(rooting medium, R 배지)에 옮겼다. R 배지는 십자화과 작물에서 성공적으로 적용된 Gambhir et al. 2017을 참고하였다. 옮겨진 모든 싹은 R 배지에 성공적으로 뿌리를 내렸다. 마침내, 양배추와 콜리플라워는 본엽에서 유래한 원형질체로부터 성공적으로 재분화되었다. 본 연구의 본엽 유래 원형질체 유도 재분화 프로토콜은 브로콜리, 케일, 콜라비 등 다른 십자화과 작물의 원형질체 유도 재분화에도 적용될 수 있다. 원형질체에서 재분화 식물에 이르는 모든 절차는 도 6에 나와있다.

도면

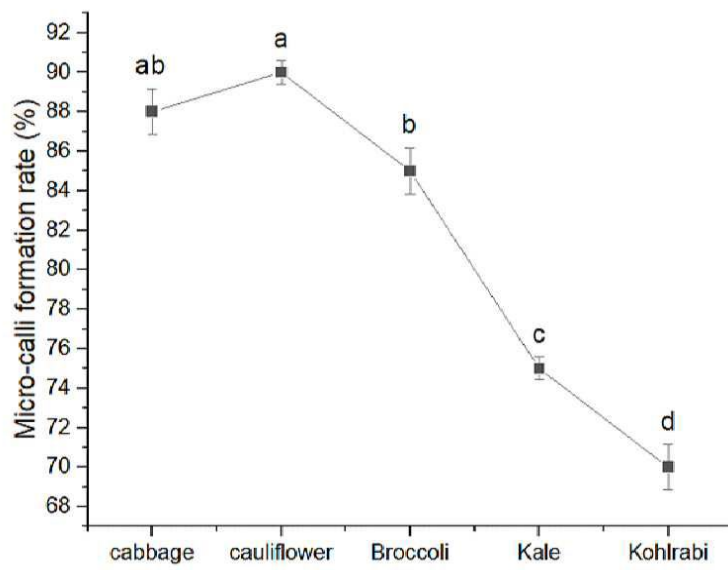
도면1



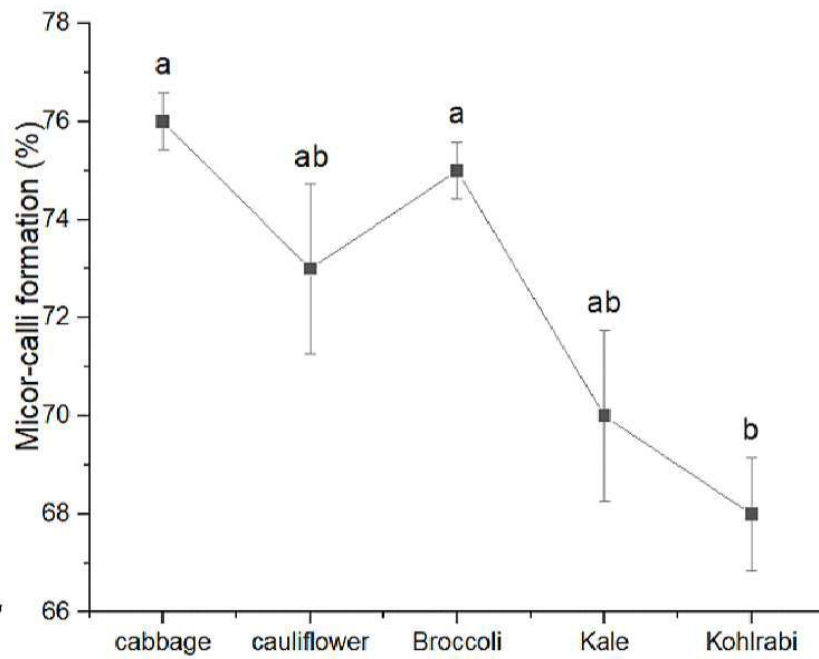
도면2



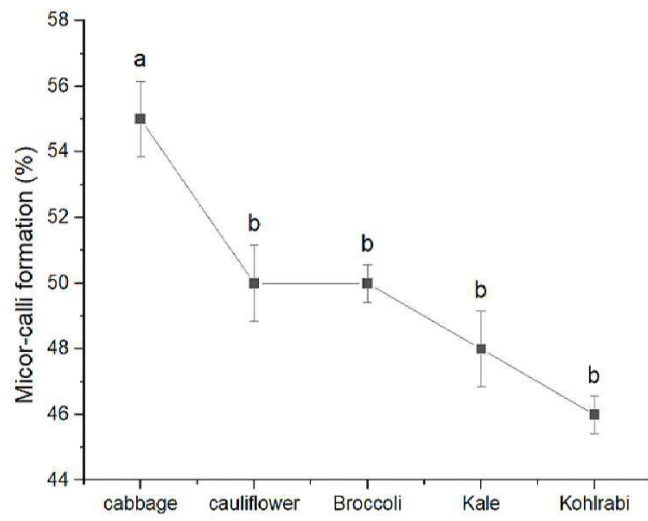
도면3a



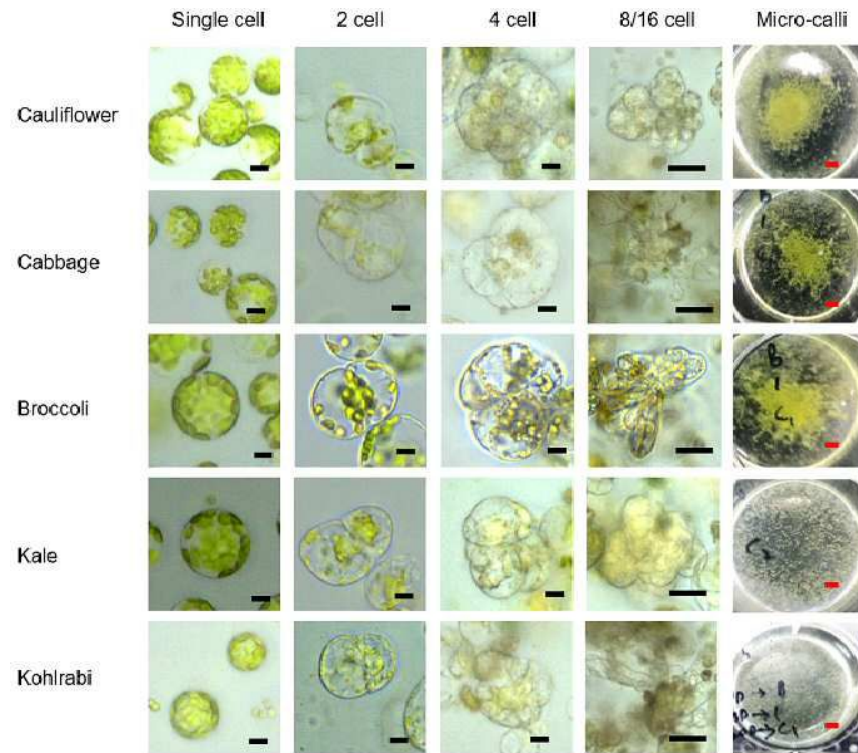
도면3b



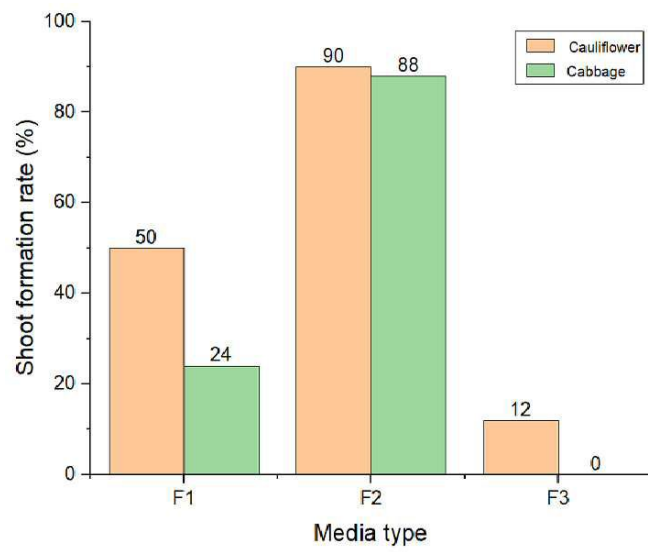
도면3c



도면4



도면5



도면6

