

유체의 응성배우체 발생 중 RNA 합성의 변화

金 文 子

(목원대학교 생물학과)

Changes in RNA Synthesis During Male Gametogenesis of *Brassica napus*

Kim, Moon Za

(Department of Biology, Mokwon University, Taejeon)

ABSTRACT

The pattern of RNA synthesis during male gametogenesis of *Brassica napus* was studied using ³H-uridine autoradiography. No incorporation of isotope occurred in the newly released microspore and the nonvacuolate, furrowed microspore. Peak incorporation of label during male gametogenesis occurred in the uninucleate microspores showing various degrees of vacuolation. In this microspore stage, silver grains were localized in the nucleus and cytoplasm. Moderate incorporation of the isotope occurred in the nucleus of the vacuolated microspore. After the microspore mitosis, isotope incorporation occurred predominantly in the nucleus of the vegetative cell with little or no incorporation in the generative cell. In tricellular pollen, no incorporation of isotope was observed in both the vegetative nucleus and the sperms. Silver grains almost completely disappeared from tricellular mature pollen grains ready to germinate.

서 론

피자식물의 응성배우체 즉 화분은 정세포를 배낭의 난세포까지 운반해 주는 기능을 갖도록 특수하게 분화된 것으로 소포자모세포의 감수분열 결과 생겨난 소포자의 발아에 의해 생겨난다. 즉 사분자기의 callose wall을 터트리거나 소포자는 소포자 분열에 의해 크기가 큰 영양세포와 작은 크기의 생식세포가 생겨난 2세포 화분이 되고 이 중 생식세포가 분열하여 두 개의 정세포가 생겨나게 되는데 생식세포가 분열하는 시기는 식물에 따라 달라 화분이 아직 약강안에 있을 때 일어나거나(3세포성 화분) 또는 주두에 떨어져 화분관이 발아되면서 일어난다(2세포성 화분). 생겨난 두 개의 정세포는 중복수정을 하여 배와 배유를 만들게 되며 영양세포의 핵은 퇴화되거나 흔적소기관(vestigial organelle)으로 남게된다(Bhojwani and Bhatnagar, 1979; Went and Willemse, 1984).

많은 식물에서 발달 적기의 약을 배양하면 약강안의 소포자는 그 발달 방향을 바꾸어 응성배우체로 발달하는

대신 배로 발달하여 반수체가 된다. 그러나 배로 발달하는 소포자는 약강안의 소포자 중 극히 일부이고 대부분의 소포자는 퇴화된다. 그동안 약이나 소포자를 배양하여 소포자배를 획득하고자 할 때 약내 소포자의 대부분이 배로 발달되도록 하기 위해 배양 전에 여러가지 전처리를 한다거나 배양조건을 달리하는 등의 연구가 많이 이루어졌다. 그러나 근본적으로는 소포자가 배우체로 발달하는 대신 배로 발달하게 되는 기구를 밝힐수 있어야 하는데 최근 이러한 의미에서 화분발달에 관한 세포학적 생화학적 연구가 큰 의의를 갖게 되었다.

그동안 성숙화분이나 화분 발아 및 화분관 신장시 RNA 합성을 조사한 연구는 비교적 많이 이루어져서 *Tradescantia paludosa*(Frankis and Mascarenhas, 1980), 옥수수(Mascarenhas *et al.*, 1984; Willing *et al.*, 1988), 담배(Tupy, 1982) 등의 성숙화분에는 이미 합성된 mRNA가 있으며 이 mRNA는 화분관 발아 및 초기 화분관 신장시 중요한 기능을 갖는 것으로 알려져 있다(Mascarenhas, 1975). 화분 발아 및 화분관 신장시 RNA 합성은 2세포 화분의 영양

세포와 생식세포 모두에서 일어나며(Mascarenhas, 1966; 1975; Reynold and Raghavan, 1982) 3세포 화분인 rye에서도 영양세포와 생식세포 모두 RNA를 합성하는 것으로 알려져 있다(Haskell and Rogers, 1985). 또 피자식물 뿐 아니라 나자식물인 *Pinus taeda*(Frankis, 1990)에서도 화분 발아시 영양세포와 생식세포 모두 active하여 RNA를 합성하는 것으로 알려져 있어 화분 발아나 화분관 신장시 대부분의 식물이 영양세포와 생식세포가 모두 RNA를 합성하는 것으로 알려져 있다.

화분 발달 중의 RNA 합성에 관한 연구는 성숙 화분이나 화분 발아시에 비해 많이 이루어지지 못하였는데 *Tradescantia*(Mascarenhas and Bell, 1970)에서는 RNA 합성이 소포자 분열 전후에 높으며 성숙화분에서는 일어나지 않는다고 하며, *Hyacinthus orientalis* L.(Bednarska, 1984)에서는 소포자 분열 직후의 초기 2세포 화분에서부터 생식세포가 영양세포안에 있게 되는 중기 2세포 화분기까지 RNA가 합성된다고 한다. 그런데 *Tradescantia*의 경우 개약시기를 기준으로 하여 개약 몇일 전이 화분 발달의 어느 시기에 해당될 것이라고 추정된 것으로 화분 발달 단계가 정확한 것이 아니며 *Hyacinthus*에서는 이미 소포자 분열이 일어난 이후의 2세포 화분에서부터 조사한 것으로 감수분열 후의 초기 소포자부터 성숙화분까지 발달 단계 별로 RNA 합성 시기와 양상을 조사한 것은 사리폴(Raghavan, 1981)의 경우를 제외하고는 매우 드물다.

최근에는 분자유전학적 기술의 발달로 소포자가 화분으로 분화 발달하는데 따른 변화를 DNA 수준에서 구명할 목적으로 약이나 화분의 발달 중에 발현되는 유전자들의 cloning과 identification에 관한 연구들이 이루어지고 있으며(Mascarenhas, 1990), 유채에서도 약이나 소포자 발달 중에 발현되는 유전자들의 식별 및 특성을 밝히는 연구들이 이루어지고 있다(Robert *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1991; Shen and Hsu, 1992).

본 연구는 유채의 약을 배양할 때 소포자가 배우체로 발달하지 않고 조포체로 발달하게 되는 기구를 밝히기 위한 기초자료를 얻기 위하여 소포자가 배우체로 발달하여 배우자가 형성될 때까지의 RNA 합성 변화를 autoradiography 방법으로 추적 조사하였다.

재료 및 방법

재료 식물의 육성. *Brassica napus* L. cv Topas를 본 실험의 재료로 사용하였으며 growth chamber 내에서 재배하여 개화시켰다. Growth chamber 내의 온도는 22~23/19~20°C(광조건/암조건), 광주기는 18/6 h(광조건/암조건), 광도는 형광등과 metal lamp를 사용하여 화분 받침대 위에서 12,000~13,000 lux가 되도록 유지하였다.

영구표본의 준비. 현미경 관찰을 위한 영구표본을 준비 하기 위해 4분자기의 callose wall을 터트리고 나온 직후의 초기 1핵성 소포자에서부터 개화 직전의 3세포화분까지 각기 다른 발달단계에 있는 약을 채취하여 70% ethanol-acetic acid(3:1)에 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 것은 90%와 100% ethanol, n-propanol 및 n-butanol에 차례로 탈수시킨 후 glycol methacrylate에 포매하였다(Feder and O'Brien, 1968). 포매한 약은 rotary microtome을 사용하여 7 µm의 종단 절편을 만들어 증류수를 떨어트린 slide위에 올렸다. 과잉의 물을 제거한 후 상온에서 건조시킨 slide를 0.1% toluidine blue로 20초간 염색, 흐르는 물로 수세하여 탈수한 후 Euparal로 봉합하였다.

Autoradiography. 소포자 및 화분에 ³H-uridine이 incorporation되는 것을 조사하기 위해 약을 채취한 직후 10 µCi/mL ³H-uridine(specific activity 29.7 Ci/mmol; Amersham Corporation)이 첨가된 B5기본배지에 2, 4, 7 시간 동안 상온에서 침지 처리하였다. 방사선 동위원소 처리가 끝난 약은 label되지 않은 uridine 10 mg/L 용액으로 2~3회 수세한 후 acetic-alcohol로 고정하고 앞에서와 같이 탈수, 포매하여 7 µm의 종단절편을 만들었다. 증류수를 떨어트린 slide위에 절편을 올린 후 과잉의 증류수를 제거하고 상온에서 건조시켰다. Autoradiography를 위해 염색전의 건조된 slide를 증류수와 동량의 비율로 희석한 Kodak NTB₃ liquid emulsion(Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.)에 2~3초간 침지한 후 상온의 암실에서 24시간 건조시켰다. 건조된 slide는 4~6°C의 냉장고에 암상태로 4, 5, 6주간 보관한 후 증류수와 동량의 비율로 희석한 D-19로 14°C에서 6분간 현상, acid fixer로 고정, running water에서 30분 이상 수세하였다. 수세가 끝난 것은 Azur B로 염색, 탈수하여 Euparal로 봉합하였다(Raghavan, 1979b). ³H-uridine이 RNA에 incorporation되는 것을 확인하기 위해 emulsion을 처리하기 전 발달단계 별로 기준 slide에 RNase(Sigma Chemical Co., 1 mg/mL 0.05 M phosphate buffer)를 37°C에서 24시간 처리하였다.

RNA 함량 변화 조사. Slide는 ×100 oil immersion objective를 사용하여 조사하였다. ³H-uridine이 incorporation된 정도를 조사하기 위해 핵과 세포질상에 나타나는 silver grain의 수를 세었으며 back ground를 추정하기 위해 표지된 화분의 인접한 곳에서도 silver grain의 수를 세었다. Grain의 수는 25~40개의 화분에서 세었다.

결과 및 고찰

소포자의 응성배우체로의 발달. 유채의 응성배우체 발달 단계에 따른 RNA 합성 변화를 조사하기 위한 기초로 초기소포자부터 성숙화분까지 각 발달 단계에 따른 세포

Table 1. Distribution of autoradiographic silver grains over pollen grains and pollen nuclei at different stages of pollen development following incorporation of ³H-uridine^a

Stage of pollen development	No. of silver grains ± SE		
	Whole pollen grain ^b	Nucleus	Vegetative nucleus
Uninucleate, just released from tetrad	0		
Uninucleate, central nucleus, furrowed	1.5 ± 0.2		
Uninucleate, varying degree of vacuolation	29.5 ± 5.8	13.6 ± 3.7	
Uninucleate, vacuolate, peripheral nucleus	23.0 ± 6.9	12.6 ± 4.4	
Bicellular	19.4 ± 4.8		12.5 ± 3.2
Tricellular	0		

^aSilver grains were counted from 20~50 pollen grains in which the nucleus and nucleolus were visible. ^bCounts of silver grains from both cytoplasm and nucleus were included.

학적 변화를 조사하였다. 4분자기의 callose wall을 터트리 고 나온 직후의 소포자는 크기가 작았고 한 개의 핵을 가진 핵은 소포자에 비해 크기가 크며 중심에 위치해 있었다(Fig. 1). 이와 같은 초기의 소포자는 크기가 급속하게 커지고 벽이 발달하게 되는데 발아공이 발달될 부분에는 벽물질이 집적되지 않아 3개의 발아공이 뚜렷하게 되어 유체 화분 고유의 furrowed한 외형을 나타내었다(Fig. 2). 벽이 발달한 소포자는 크기가 커지고 액포가 나타났으며 중심에 위치해 있던 핵은 벽의 어느 한쪽으로 이동하기 시작하였는데 이와 같은 시기의 소포자들은 검경시 핵과 세포질이 없는 공허한 소포자들로 나타나기도 하였다. 핵이 벽쪽으로 이동하고 액포화된 후기 소포자는 cell cycle의 S 또는 G2 시기에 있게 되어 핵의 크기가 뚜렷하게 커졌는데(Fig. 3) 이와 같은 소포자들은 곧 분열하여(microspore mitosis) 크기가 큰 영양세포와 작은 크기의 생식세포가 생겨난 2세포 화분이 되었다(Fig. 4). 분열 결과 생겨난 영양세포에서는 세포질 합성이 왕성하게 일어나고 액포가 사라지게 되므로 농후한 세포질을 갖는 화분이 되었다. 분열직후 생식세포가 화분벽에서 떨어지기 전에는 생식세포의 세포벽이 뚜렷하였으나 생식세포가 벽에서 분리된 후에는 얇은 층의 세포

질로 둘러 싸이게 될 뿐 세포벽이 사라졌다.

화분벽에 붙어있던 렌즈모양의 생식세포가 화분벽에서 떨어져 나와 구형으로 되고 영양세포의 세포질내에 있게 되면 곧 분열하여 두 개의 정세포가 생겨났다(Fig. 5). 이때 영양세포의 세포질이 농후하고 정세포의 형태가 영양핵과 같은 구형으로 되어 있었으나 영양세포의 핵은 정세포에 비해 크기가 크고 diffuse되어 있으며 인이 뚜렷하게 커서 구별되었다. 정세포가 생겨난 3세포 화분에서는 세포질이 더욱 농후하게 되고 구형이었던 정세포는 점차 정세포 고유의 초생달 형태로 분화되었다(Figs. 6 and 7). 이 시기에는 농후한 세포질로 인해 영양세포의 핵은 잘 관찰되지 않고 정세포만 뚜렷하게 나타나는 경우가 많았다.

유체의 응성배우체 발달 중에 일어난 세포학적 변화는 기왕에 보고한 바와 같다(Kim, 1992b). Squash method가 아닌 microtoming에 의한 절편에서도 화분 발달의 각 단계가 뚜렷하게 구별될 수 있었던 것은 paraffin이 아닌 glycolmethacrylate에 포매하여 세포질의 소실을 줄이고 더 얇은 박편을 만들 수 있었기 때문이었던 것으로 생각된다.

응성배우체 발달 중의 RNA 합성 변화. ³H-uridine을 처리하여 RNA 합성 변화를 조사하고자 처리시간을 2, 4, 7시간의 3가지로 달리 하였던 바 처리시간이 길어질수록 silver grain의 수가 다소 증가하였는데 이에 따라 background도 높게 되어 동위원소가 incorporation되는 정도를 비교하기에는 4시간이나 7시간 처리보다 2시간 처리가 효과적이었다. 또 emulsion 처리 후 냉암소에서의 노출시간을 4, 5, 6주의 3가지로 달리하였던 바 노출시간이 길어져도 silver grain이 나타나는 정도에 큰 차이가 없어 실험기간을 단축할 수 있다는 점에서 4주간이 적합한 것으로 나타났다. ³H-uridine이 RNA에 incorporation되는 여부를 확인하기 위해 RNase를 처리한 slide에서는 silver grain이 나타나지 않았다.

발달 단계가 각기 다른 소포자 및 화분에서 autoradiography에 의한 silver grain의 분포를 보면 Table 1에서와 같다. 사분자기의 callose wall에서 나온 직후의 소포자에서는 silver grain이 나타나지 않았다(Fig. 8). 소포자의 크기가 커지고 핵이 중심에 위치해 있고 벽의 발달로 furrowed한 형태가 뚜렷하게 되었으나 액포가 나타나기 전의 초기 소포자에서도 silver grain은 background 이상 나타나지 않았다(Fig. 9). 세포질내에 액포가 나타나기 시작하면서 중심에 위치해 있던 핵이 점차 벽의 어느 한쪽으로 이동하기 시작하는 중기 소포자들에서는 silver grain이 나타나는 정도가 매우 높아 소포자 전체에는 약 29.5개 정도, 소포자 핵에는 13.6개 정도가 나타났는데 이는 화분발달 과정 중 가장 높게 나타난 것이다(Fig. 10). 그러나 소포자에 따른 차이가 커서 이보다 더 높게 나타나는 것이

있는가 하면 훨씬 적게 나타나는 것도 있었다. 이시기의 소포자에서는 silver grain이 핵에서 뿐만 아니라 세포질에서도 높게 나타났다(Fig. 11). 핵이 벽의 어느 한쪽에 이동하여 소포자 분열이 일어나기 직전의 액포화된 후기 소포자에서는 ^3H -uridine이 incorporation되는 정도가 중기 소포자에 비해서는 줄어들었으나 핵과 세포질에서 여전히 높게 나타났다(Fig. 12). 그러나 이 시기에 소포자에 따른 차이가 매우 커서 소포자에 따라서는 중기 소포자에서와 같은 정도로 또는 더 높게 나타나기도 하였다.

소포자 분열 결과 생겨난 2세포 화분에서도 소포자에 비해서는 줄었으나 silver grain이 비교적 높은 정도로 나타났는데 화분에 따른 차이가 커서 소포자에서와 비슷한 정도로 또는 더 높게 나타나기도 하였다. 이시기의 silver grain은 주로 영양세포에서 나타났으며 생식세포에서는 대부분의 경우 관찰되지 않았거나 극히 드물게 나타났다(Figs. 13 and 14). 2세포 화분에서도 silver grain이 영양세포의 핵에서 뿐만 아니라 세포질에서도 나타났는데 그 정도는 소포자기에 비해 크게 감소하였다. 2세포 화분에서는 소포자 분열 후 생식세포가 벽에 붙어있는 초기에서나 벽에서 떨어져 영양세포의 세포질내에 있게 되는 후기에서나 silver grain이 나타나는 정도에 큰 차이가 없었다. 생식세포가 분열하여 두 개의 정세포가 생겨난 직후의 초기 3세포 화분과 발아 직전의 농후한 세포질로 되어 있는 성숙화분에서는 영양세포와 정세포 모두에서 silver grain이 관찰되지 않았다(Figs. 15 and 16).

소포자로부터 배우체가 발달되는 동안 소포자나 화분에서 silver grain이 나타나는 정도는 중기 소포자에서 제일 높았으며 후기 소포자 및 2세포 화분에서는 점차 줄어들었다. 그러나 소포자와 영양세포의 핵 위에 나타난 silver grain은 12.5~13.6개로 큰 차이가 없었다(Table 1).

본 실험에서 background의 radioactivity가 비교적 낮았고 ^3H -uridine이 incorporation되는 정도는 background 수준보다 훨씬 높았으며 RNase 처리시에는 silver grain이 background 이상 나타나지 않았다. 또 ^3H -uridine의 처리 시간이나 emulsion 처리 후의 노출 시간이 달라짐에 따라 background나 silver grain이 나타나는 정도에는 다소 차이가 있었으나 그 시기나 양상에는 변화가 없었다. 따라서 나타난 silver grain은 ^3H -uridine이 RNA에 incorporation된 것으로 추측할 수 있었다. 본 실험 결과 RNA 합성은 그 양을 측정할 것이 아니고 ^3H -uridine이 incorporation되는 비율을 조사한 것이지만 배우체 발달 단계에 따른 RNA 합성을 비교하기에 충분하였다. 유체에서의 RNA 합성은 소포자 분열(microspore mitosis) 전의 중기 소포자에서부터 소포자 분열 후의 2세포 화분기까지 일어났는데 이는 *Tradescantia*(Mascarenhas and Bell, 1970; Taylor, 1953a)나 *Lilium*(Taylor, 1953b)에서 소포자 분열을 전후해서

RNA 합성이 높은 것과 비슷한 결과이다.

배우체 발생 중의 RNA 합성 양상에 대한 연구는 많이 이루어져 있지 않지만 식물에 따라 다를 것으로 추측된다. 사리풀에서는 silver grain이 나타나는 정도가 중기 소포자에서 높고 소포자 분열 직전의 액포화된 후기 소포자에서는 다소 줄었다가 소포자 분열 직후의 초기 2세포 화분에서 다시 높아지지만 생식세포가 화분내벽에서 떨어진 후기 2세포 화분에서는 급격히 감소된다(Reynolds and Raghavan, 1982). 이와는 달리 유체에서는 액포화가 시작되는 중기 소포자에서 가장 높게 나타났으며 후기 소포자 및 2세포 화분에서는 점차 줄었다. 그러나 생식세포가 화분벽에 붙어있는 초기 2세포 화분과 생식세포가 영양세포 안에 있게 되는 후기 2세포 화분에서는 차이가 없었다. 이와 같은 차이는 식물에 따라 배우체로의 분화 발달 과정이 다르기 때문인 것으로 생각되는데 유체에서는 생식세포가 화분벽에서 떨어지면서 곧 분열하여 정세포를 만들게 되지만 사리풀에서는 화분관이 발아되면서 생식세포의 분열이 일어난다.

Hyacinthus orientalis L.(Bednarska, 1984), *Tradescantia paludosa*(Thiebaud and Ruch, 1978), 사리풀(Reynold and Raghavan, 1982) 등의 화분에서 RNA 합성은 대부분 영양세포에서 일어나며 생식세포에서는 극히 일부만 일어난다. RNA 합성이 왕성하게 일어나는 영양세포에는 생식세포에 비해 non-histone 단백질이 많다(Thiebaud and Ruch, 1978). 또 영양세포에서 합성된 RNA는 배우체 분화와 관련된 세포질을 합성하여 화분의 크기가 커지는데 이용되고, 생식세포에서 합성된 RNA는 DNA 복제에 필요한 histone과 효소단백질을 만드는데 이용된다(Bednarska, 1984). 유체에서도 2세포 화분에서의 silver grain은 주로 영양세포에서 나타났으며 생식세포에서는 잘 관찰되지 않아 RNA 합성은 영양세포에서 더욱 활발하게 일어나는 것으로 나타났다. 이들 RNA는 다른 식물에서처럼 배우체성 세포질 합성에 이용될 것으로 추측된다.

사리풀에서는 소포자의 silver grain은 주로 핵에서 나타났으며 세포질에서는 나타나지 않았고 소포자 분열 후 2세포 화분에서는 핵 뿐만 아니라 세포질에서도 나타났다(Reynold and Raghavan, 1982). 이와는 달리 유체에서는 중기 소포자에서는 핵 뿐만 아니라 세포질에서도 높게 나타났으며 2세포 화분의 세포질에서는 소포자기에 비해 매우 낮게 나타났다. 이와 같은 차이는 동위원소의 집적이 유체에서는 중기 소포자에서 가장 높았고 사리풀에서는 2세포 화분에서 높았던 때문인 것으로 생각된다. Silver grain은 핵에서도 chromatin이나 핵의 다른 부위에 비해 인에서 높게 나타났다. 따라서 ^3H -uridine에 표지된 RNA는 대부분이 rRNA인 것으로 생각되며 인 이외에 chromatin이나 세포질에서 나타난 silver grain은 mRNA에 의한 것

이거나 인에서 생성된 RNA의 이동에 의한 것으로 추측되지만 앞으로 합성된 RNA 유형과 화분 발달 중 이들의 기능을 밝힐 수 있는 연구가 시급히 요구된다.

유체에서 적기의 약을 배양하면 약내 소포자 중 일부는 배우체로 발달하는 대신 조포체로 발달한다(Kim, 1992a). 소포자가 조포체로 발달하게 되는데 따른 세포학적 연구는 유체를 비롯하여(Kim, 1992b) 많은 식물에서 이루어졌으나 분자 수준에서의 연구는 많지 않다. 사리풀(Raghavan, 1979 a, b)에서는 소포자가 배로 발달하게 되는 것은 배양직후에 결정되며 이와 같은 소포자에서는 배양직후에 배로 발달하는데 필요한 mRNA가 새로 전사된다. 또 이 식물에서는 생식세포가 계속 분열하여 배로 발달하게 되는데(Raghavan, 1976, 1978) 배양 후 RNA 합성이 생식세포 또는 생식세포와 영양세포에서 일어날 때는 배로 발달하지만 영양세포에서만 일어날 때에는 배로 발달하지 못한다(Raghavan, 1981). 따라서 사리풀에서는 소포자가 배로 발달하게 되는 것은 배우체로 발달할 때와는 달리 생식세포에서 조포체 발달에 필요한 RNA가 새로 합성되어야만 한다는 것이 분명하게 되었는데 이와 같은 연구는 사리풀을 비롯한 몇몇 식물에서만 이루어 졌을 뿐 소포자배가 생겨나는 다른 많은 식물들에서 아직 이루어지지 못하고 있다. 본 연구에서는 약배양시 소포자배 발달에 따른 RNA 합성을 비교하지는 못했으나 음성배우체 발달 단계에 따른 RNA 합성 시기와 양상이 분명하게 되었는데 이와 같은 연구 결과는 음성배우체 발달 중의 유전자 발현에 관한 분자유전학적 연구를 수행하는데 기초가 될 뿐만 아니라 약배양에 의한 소포자배 발생 기구를 밝히는 데에도 중요한 기초자료가 될 것으로 생각된다.

적 요

유체의 소포자배 발생 기구를 밝히기 위한 기초자료를 얻기 위하여 소포자가 화분으로 발달되는 중의 RNA 합성 변화를 autoradiography에 의해 조사하였다. 4분자기에서 나온 직후의 소포자와 액포가 생기기 전의 초기 소포자에서는 silver grain이 나타나지 않았다. Silver grain은 액포가 나타나기 시작하는 중기 소포자의 핵과 세포질에서 화분 발달 중 가장 높게 나타났으며 액포화된 후기 소포자에서도 중기 소포자에 비해서는 낮았으나 핵과 세포질에서 비교적 높게 나타났다. 2세포 화분에서도 소포자에 비해서는 다소 줄었으나 silver grain이 비교적 높게 나타났는데 대부분이 영양세포의 핵에서 나타났으며 생식세포에서는 관찰되지 않거나 극히 드물게 나타났다. 생식세포가 분열한 3세포 화분에서는 영양세포와 정세포 모두에서 silver grain이 나타나지 않았다.

사 사

본 논문은 1991년도 한국과학재단 연구비지원(과제번호: 911-0405-086-2)에 의한 연구 결과이다.

참 고 문 헌

- Bednarska, E. 1984. Ultrastructural and metabolic transformations of differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grain cells. I. RNA and protein synthesis. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 53: 145-158.
- Bhojwani, S.S. and S.S. Bhatnagar. 1979. The embryology of angiosperms. Vikas, New Delhi. pp. 102-119.
- Feder, N. and T.P. O'Brien. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am. J. Bot.* 55: 123-142.
- Frankis, R.C. 1990. RNA and protein synthesis in germinating pine pollen. *Jour. Exp. Bot.* 1: 1469-1473.
- Frankis, R. and J.P. Mascarenhas. 1980. Messenger RNA in the ungerminated pollen grain: a direct demonstration of its presence. *Ann. Bot.* 45: 595-599.
- Haskell, D.W. and O.M. Rogers. 1985. RNA synthesis by vegetative and sperm nuclei of trinucleate pollen. *Cytologia* 50: 805-809.
- Kim, M.Z. 1992a. Effects of growth conditions of donor plants, temperature pretreatment, and culture media on anther culture of *Brassica napus* L. *Korean J. Plant Tissue Culture* 19: 213-218.
- Kim, M.Z. 1992b. Development of microspores during anther culture of *Brassica napus* L. *Korean J. Plant Tissue Culture* 19: 295-303.
- Mascarenhas, J.P. 1966. Pollen tube growth and ribonucleic acid synthesis by vegetative and generative nuclei of *Tradescantia*. *Am. J. Bot.* 53: 563-569.
- Mascarenhas, J.P. 1975. The biochemistry of angiosperm pollen development. *Bot. Rev.* 41: 259-314.
- Mascarenhas, J.P. 1990. Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 41: 317-338.
- Mascarenhas, N.T., D. Bashe, A. Eisenberg, R.P. Willing, C.M. Xiao and J.P. Mascarenhas. 1984. Messenger RNAs in corn pollen and protein synthesis during germination and pollen tube growth. *Theor. Appl. Genet.* 68: 323-326.
- Mascarenhas, J.P. and E. Bell. 1970. RNA synthesis during development of the male gametophyte of *Tradescantia*. *Dev. Biol.* 21: 475-490.
- Raghavan, V. 1976. Role of the generative cell in androgenesis in henbane. *Science* 191: 388-389.
- Raghavan, V. 1978. Origin and development of pollen embryo.

- yoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger*. *J. Bot.* **65**: 984-1002.
- Raghavan, V. 1979a. Embryogenic determination and ribonucleic acid synthesis in pollen grains of *Hyoscyamus niger*. *Am. J. Bot.* **66**: 36-39.
- Raghavan, V. 1979b. An autoradiographic study of RNA synthesis during pollen embryogenesis in *Hyoscyamus niger* (henbane). *Am. J. Bot.* **66**: 784-795.
- Raghavan, V. 1981. Distribution of poly(A)-containing RNA during normal pollen development and during induced pollen embryogenesis in *Hyoscyamus niger*. *J. Cell Biol.* **89**: 593-606.
- Reynolds, T.L. and V. Raghavan. 1982. An autoradiographic study of RNA synthesis during maturation and germination of pollen grains of *Hyoscyamus niger*. *Protoplasma* **111**: 117-188.
- Roberts, M.R., F. Robson, G.D. Foster, J. Draper, and R.J. Scott. 1991. A *Brassica napus* mRNA expressed specifically in developing microspores. *Plant Mol. Biol.* **17**: 295-299.
- Scott, R., E. Dagless, R. Hodge, W. Paul, I. Soufleri and J. Draper. 1991. Patterns of gene expression in developing anthers of *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* **17**: 195-207.
- Shen, J.B. and F.C. Hsu. 1992. *Brassica* anther-specific genes: characterization and in situ localization of expression. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 379-389.
- Taylor, J.H. 1953a. Autoradiographic detection of incorporation of ^{32}P into chromosomes during meiosis and mitosis. *Exptl. Cell Res.* **4**: 164-173.
- Taylor, J.H. 1953b. Incorporation of phosphorous-32 into nucleic acids and proteins during microgametogenesis of *Tulbaghia*. *Am. J. Bot.* **45**: 123-131.
- Thiebaud, C.H. and F. Ruch. 1978. Cytophotometric study of nuclear differentiation during pollen development in *Tradescantia paludosa*. *Histochemistry* **57**: 119-128.
- Tupy, J. 1982. Alterations in polyadenylated RNA during pollen maturation and germination. *Biol. Plant* **24**: 331-340.
- Went, J.L. and M.T.M. Willemse. 1984. Fertilization. In, Embryology of angiosperms, B.M. Johri (ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 302-308.
- Willing, R.P., D. Bashe and J.P. Mascarenhas. 1988. An analysis of the quantity and diversity of messenger RNAs from pollen and shoots of *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.* **75**: 751-753.

(1993. 5. 20 接受)

Explanation of Figures

Figs. 1~7. Pollen development in *B. napus*. Fig. 1. Uninucleate microspore, immediately after release from tetrad. Fig. 2. Uninucleate, nonvacuolate, furrowed microspore. Fig. 3. Uninucleate, vacuolate microspore. Fig. 4. Bicellular pollen grain showing the large vegetative cell (v) and smaller generative cell (g). At this stage the generative cell is attached to the intine of the pollen. Fig. 5. Tricellular pollen, immediately after division of the generative cell. Fig. 6. Tricellular, densely stained pollen. A protoplasmic protrusion (arrow) present. Fig. 7. Tricellular, densely stained pollen. The nucleus of vegetative cell is out of focus while the elongated sperm cells can be seen clearly. Calibration bar (10 μm) in Figure 1 applies to all the figures from 1 to 7.

Figs. 8~12. Autoradiographs showing incorporation of ^3H -uridine into uninucleate microspore of *B. napus*. Fig. 8. Absence of label in the newly released microspore. Fig. 9. Incorporation of the isotope into nonvacuolate microspore is barely visible. Figs. 10-11. Dense incorporation of label into the microspore exhibits varying degrees of vacuolation. The label is in both the nucleus and cytoplasm. Fig. 12. Dense incorporation of label into the vacuolate microspore. The label is mostly in the nucleus. (A) Focus on silver grains. (B) Focus on nuclei. Calibration bar (10 μm) in Figure 8 applies to all the figures from 8 to 12.

Figs. 13~16. Autoradiographs showing incorporation of ^3H -uridine into bicellular and tricellular pollen grains of *B. napus*. Fig. 13. Bicellular pollen grain just after the microspore mitosis while the generative cell (g) is still attached to the intine. Incorporation is mainly in the vegetative nucleus (v). Generative cell does not appreciably incorporate the label. Fig. 14. Bicellular pollen grain after the generative cell (g) detached from the intine. Incorporation is mainly in the vegetative nucleus (v). Fig. 15. Tricellular pollen immediately after division of the generative cell. Silver grains are not found in both vegetative nucleus (v) and sperm cells (s). Fig. 16. Mature tricellular pollen grain showing the absence of silver grains in vegetative nucleus and sperm cells (s). (A) Focus on silver grain. (B) Focus on nuclei. Calibration bar (10 μm) in Figure 13 applies to all the figures from 13 to 16.





