

## 국내육성 유채품종의 생체 내 화분발육 비교

박윤정<sup>†</sup> · 김광수 · 장영석 · 김철우 · 방진기

농촌진흥청 작물과학원 목포시험장

### Comparison with *in Vivo* Pollen Development of Domestic Cultivars in *Brassica Napus* L.

Yoon-Jung Park<sup>†</sup>, Kwang-Soo Kim, Young-Seok Jang, Chul-Woo Kim, and Jin-Ki Bang

Mokpo Experiment Station, National Institute of Crop Science, RDA, Muan 530-834, Korea

**ABSTRACT** This study was showed into the pollen development with *in vivo* by bud size and genotype. Microspores of buds from 2.0 mm to 2.5 mm of all genotypes were composed of mainly tetrad cells and early uninucleate stage cells. Microspores derived from buds of 2.5-3.0 mm were exposed cells of early uninucleate, middle uninucleate, and late uninucleate. Microspores from buds of 3.0-3.5 mm contained mostly late uninucleate stage cells and showed some early binucleate stage cells. Microspores of buds with 3.5-4.0 mm in length were composed of mainly binucleate stage cells and decreased late uninucleate stage cells. Microspore with more than 4.0 mm were entered into binucleate stage cells of divided generative nucleus and vegetative nucleus. In 'Tamlayuchae', microspores derived from buds of 3.5-4.0 mm were observed cells of late uninucleate stage and early binucleate stage because of late microspore development. In MS-maintainer, the spring type, microspore derived from buds of 2.5-3.0 mm were observed tetrad stage cells.

**Keywords** : doubled-haploid, microspore, pollen development, rapeseed

**유채**(*Brassica napus* L.)는 국내 재배 유지작물 중 단위면적당 수유량이 가장 많고 이모작 등의 이점이 있어 식용, 샐러드용, 항공기 윤활유, 세제의 정화제 및 천연디젤연료 등으로 이용하고 있으며, 관광자원작물로도 부가가치가 높은 작물중하나이다. 식용의 경우는 토코페롤 함량이 높아 캐나다, 미국, 영국 및 프랑스 등에서 섭취가 매년 급증하고 있는 추세이며 최근에는 고유가로 인해 대체 에너지에 대한

관심이 높아지고 있다. 특히 바이오디젤의 원료로 사용되는 유채의 종자에는 기름함량이 35~45%정도이며, 지방산 조성은 올레인산, 리놀산, 리놀렌산 및 에루진산으로 구성되어 있다. 바이오디젤로 적합한 유채는 올레인산 함량이 높을수록 유리하며 따라서 올레인산의 함량이 높은 품종의 조기 육성이 절실하다. 유채의 육종에는 교배육종, 선발육종 등의 고전육종 뿐만 아니라 기내에서 조직배양에 의한 육종법도 사용되고 있다. 조직배양을 이용한 육종에서 가장 널리 사용되는 방법이 소포자 배양법이나 소포자 배양을 통한 추파형 유채의 반수체 발생율은 매우 낮은 실정이다. 배발생 효율을 높이기 위한 소포자 배양 조건에 대해 검토한 결과 배발생이 가능한 소포자를 포함하고 있는 화뢰를 정확하게 선발하고 동정하는 것이 필수적이며, 소포자 분리시키는 1핵기말기 또는 2핵기초기가 효과적이라는 것이 밝혀졌다(Chuong & Beversdorf, 1985; Pechan & Keller, 1988; Lichter, 1982). 그러므로 1핵기말기 또는 2핵기초기의 배발생적인 소포자의 밀도가 높은 소포자의 집단을 획득하기 위해서는 세포학적 연구가 필수적이다. 특히 유채의 배발생적 소포자의 세포학적 관찰은 feulgen과 acetocarmine과 같은 염색약을 이용한 염색이 어려워 별다른 진전을 보지 못했다(Jang *et al.*, 2000). Coleman & Goff(1985)가 DAPI(4,6-diamidino-2-phyeylindole)를 이용하여 화분핵을 조사하는 방법을 제시한 것을 계기로 배발생적 소포자인 1핵기말기 또는 2핵기초기의 소포자를 대량으로 분리하는 것이 다소 용이하게 되었다.

본 연구에서는 *B. napus*의 추파품종을 재료로 하여 분리한 소포자 배양에 의해 배가 생산되는 효율을 검토하고, 반수체 생산 제고를 위한 기초자료를 얻고자 품종 간 화뢰의 크기에 따른 생체 내 화분발육 상태를 비교, 관찰하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-61-450-0133  
(E-mail) fragrant20@naver.com

재료 및 방법

식물재료

본 시험은 목포시험장에서 보유하고 있는 국내 육성 품종 추파형인 ‘한라유채’를 포함한 8가지 품종을 공시하여(Table

1), 2005년 9월 20일날 종자를 파종한 다음 본엽이 7~8매 정도까지 전개될 때까지 육묘 후 11월 2일에 시험장 내의 철재파이프로 제작된 400평 규모의 비닐하우스에 정식하고 12월 5일부터 하우스 온도를 20-25°C/8°C(주간/야간)로 조절하여 생육시켜진 식물체를 사용하였다.

**Table 1.** The comparison of the frequency of microspore nuclear stage according to flower bud size between spring type (Lisandra) and winter type (eight variety)

Variety	Bud-size	Development stage pollen (%)					
		TE	EU	MU	LU	VG	VSS
Lisandra	2.0-2.2		67.7±4.3	22.6±2.4			
	2.7-3.0		8.6±2.3	49.6±3.1	41.7±3.4		
	3.1-3.3		4.5±1.2	29.9±4.3	65.6±4.5		
	3.4-3.7			16.2±2.3	52.3±4.3	31.5±3.2	
	3.8-4.1			13.2±2.1	22.7±2.5	64.1±4.7	
	4.2-			2.4±1.2	11.2±1.6	86.3±5.5	
Halla	2.0-2.5	9.9±3.4	90.1±3.4				
	2.5-3.0		11.1±2.5	24.1±1.8	64.4±3.8		
	3.0-3.5			25.2±3.3	53.8±4.5	31.2±3.7	
	3.5-4.0				40.7±3.3	63.8±4.5	5.5±1.7
	4.0-4.5					58.8±5.5	41.2±4.8
Tamla	2.0-2.5	70.0±3.9	19.3±2.8	10.3±3.3			
	2.5-3.0		56.1±5.5	23.9±3.9	20.0±3.9		
	3.0-3.5			51.3±4.5	30.2±5.5	18.5±3.4	
	3.5-4.0				70.1±6.3	20.4±3.1	9.5±3.5
	4.0-4.5					55.5±4.1	44.5±4.1
Tammi	2.0-2.5	20.8±4.5	79.2±4.5				
	2.5-3.0		10.0±3.6	26.5±2.6	63.5±4.8		
	3.0-3.5			8.0	20.4±3.3	71.6±5.1	
	3.5-4.0				5.1±1.2	89.4±6.2	5.5±2.0
	4.0-4.5					56.8±5.5	43.2±5.5
Youngsan	2.0-2.5	20.3±5.4	79.7±4.5				
	2.5-3.0		35.0±3.3	47.2±4.3	17.8±2.2		
	3.0-3.5			37.8±4.0	53.6±5.2	8.6±0.9	
	3.5-4.0				18.7±1.8	59.2±3.5	26.4±4.2
	4.0-4.5					20.0±4.9	80.0±4.9
Mokpo 64 <sup>#</sup>	2.0-2.5	91.6±3.3	8.4±3.3				
	2.5-3.0	25.0±2.5	63.2±5.2	11.8±2.5			
	3.0-3.5		64.6±5.3	12.3±3.3	23.1±4.7		
	3.5-4.0			11.4±1.7	56.6±4.4	32.0±3.7	
	4.0-4.5				12.5±2.1	67.5±5.5	20.0±2.7
Mokpo 68 <sup>#</sup>	2.0-2.5	72.7±3.3	27.3±3.3				
	2.5-3.0		55.6±4.4	34.0±3.5	10.4±2.1		
	3.0-3.5			20.1±2.5	59.9±5.1	20.0±4.5	
	3.5-4.0				17.3±3.3	65.4±6.4	20.3±5.1
	4.0-4.5					92.3±5.5	7.7±5.5
Mokpo 111 <sup>#</sup>	2.0-2.5	50.0±4.5	35.7±3.7	14.3±3.3			
	2.5-3.0		25.8±2.7	40.0±4.2	34.2±3.9		
	3.0-3.5			15.0±5.3	75.0±6.3	10.0±3.8	
	3.5-4.0					81.2±4.4	28.8±4.4
	4.0-4.5					20.0±5.5	80.0±5.5
MB-B Line	2.0-2.5	30.2±4.2	58.8±5.8	11.0±3.3			
	2.5-3.0	10.5±3.3	72.0±5.4	17.5±2.8			
	3.0-3.5		13.0±3.2	62.3±4.9	24.7±2.8		
	3.5-4.0				65.3±5.5	21.7±2.6	13.0±3.5
	4.0-4.5					76.4±5.5	23.6±4.8

Note : TE, tetrad stage; EU, early uninucleate stage; MU, mid uninucleate stage; LU, late uninucleate stage; VG, vegetative and generative nuclei present; VSS, vegetative and two nuclei present.

### 화분발육관찰

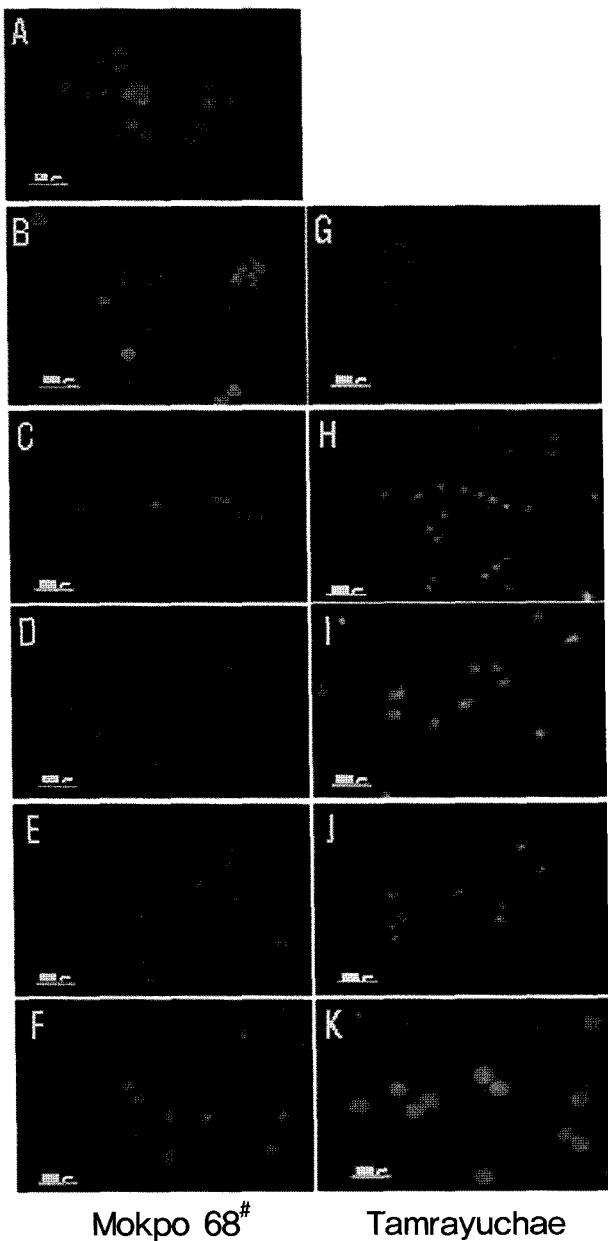
생체 내(*in vivo*)에서 품종 및 각각의 화뢰 크기별로 소포자의 배발생 정도를 비교하고자 각 품종별로 6~9정도의 꽃이 개화한 화서를 채취하여 2.0-2.5 mm, 2.5-3.0 mm, 3.0-3.5 mm, 3.5-4.0 mm, 및 4.0-4.5 mm의 5집단으로 분리하였다. 이들 각각 집단으로부터 10개씩의 화뢰를 Carnoy's 용액(acetic acid : 99% EtOH, 1 : 3)에 24시간 고정시켰다. 고정 후에 실린저로 약을 으개어 현탁액을 nylon mesh(직경 50  $\mu$ m)에 여과하여 화분을 분리한 다음 멸균수에 3회 정도 세척과정과 원심분리(1,000 rpm, 5 min)과정을 거쳤다. 원심분리 후 3% sucrose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog) 액체 배지 1 ml에 현탁한 후 10  $\mu$ l DAPI로 염색하여 형광 현미경(Nikon JP/E-600) 하에서 품종별로 화분핵의 발달단계를 관찰하였다.

### 결과 및 고찰

국내 육성 유채 품종의 화뢰의 크기에 따른 소포자의 발육 정도를 관찰하였다. 8품종에서 채취한 화뢰를 크기별로 분리하여 관찰한 결과, 품종에 따른 소포자의 생육단계의 차이를 관찰할 수 있었다. '한라유채'의 경우 화뢰의 크기가 2.0-2.5 mm로 신장되면서 거의 대부분이 1핵기 초기의 소포자들로 구성되어 있었고, 4분자기는 아주 드물게 보였다. 2.5-3.0 mm 크기일 때, 소포자들은 1핵기초기 11.1%, 중기 24.1% 및 말기 64.4%의 비율로 구성되어 있었으며, 1핵기말기가 다수를 점하고 있었다. 화뢰가 3.0-3.5 mm 크기일 때, 소포자들이 1핵기중기 25.2%, 말기 53.8% 및 2핵기초기 31.2%의 비율로 구성되어 있어 1핵기말기 상태에서 2핵기초기상태로 발육이 진전된 것이 관찰되었다. 화뢰의 크기가 3.5-4.0 mm일 경우, 분리한 소포자들은 생식핵과 영양핵이 구분된 2핵성화분이 63.8%로 가장 많았고 1핵기말기는 40.7%로 줄어들었다. 화뢰의 크기가 4.0 mm 이상일 때 2핵성화분(58.8%)과 3핵성화분(41.2%)으로만 구성하고 있었다. '탐라유채'의 경우, 2.0-2.5 mm에서는 4분자기가 70%로 대부분을 차지하고 있었으며, 1핵기초기 19.3% 및 중기 10.3%로 구성되어 있었다(Fig. 1G). 2.5-3.0 mm 크기의 경우, 1핵기초기 56.1%, 중기 23.9% 및 말기 20%의 비율로 구성되어 있었으며(Fig. 1H), 3.0-3.5 mm 크기에서는 1핵기중기 51.3%, 말기 30.2% 및 2핵기초기 18.5%의 비율로 나타났으며 1핵기중기가 다수를 점하고 있었다(Fig. 1I). 3.5-4.0 mm의 크기의 경우, 다수의 1핵기말기 소포자(70.1%)와 2핵기초기의 소포자(20.4%)가 관찰되었으며, 낮은 비율의 3핵성화분도 관찰 되었고(Fig. 1J), 화뢰의 크기가 4.0 mm 이상일

때는 2핵성화분(55.5%)과 3핵성화분(44.5%)만으로 구성되어 있었다(Fig. 1K). '탐미유채'와 '영산유채'의 두 품종 모두 2.0-2.5 mm 크기의 화뢰에서 1핵기초기의 소포자가 가장 높은 비율로 나타났으며, 3.5-4.0 mm 크기일 때, 두 품종 모두 2핵기화분이 다수를 차지하고 있었다. '목포 64호'와 '목포 68호'의 두 계통의 경우, 2.0-2.5 mm 크기에서 4분자기가 대부분을 차지하고 있었으며(Fig. 1A, 1B), 2.5-3.0 mm 크기일 때 '목포 64호'의 경우 4분자기 25%, 1핵기초기 63.2% 및 중기 11.8%의 비율로 나타내고 있었으며, '목포 68호'의 경우 1핵기초기 55.6%, 중기 34% 및 말기 10.4%의 비율로 구성되어 있었다(Fig. 1C). 3.0-3.5 mm 크기의 경우, '목포 64호'는 1핵기초기 64.6%, 중기 12.3% 및 말기 23.1%의 소포자들이 관찰되었으나 다른 품종과 달리 2핵기화분이 전혀 관찰이 되지 않았고 '목포 68호'는 1핵기말기 65.4% 및 2핵기화분이 20%의 비율로 나타났다(Fig. 1D). 화뢰의 크기가 3.5-4.0 mm일 때, '목포 64호'의 경우 다수의 1핵기말기 소포자가 다수를 점하고 있었으며(Fig. 1E), '목포 68호'의 경우는 2핵성화분이 다수를 점하고 있었다. 4.0-4.5 mm 크기일 경우 '목포 64호'는 1핵기 말기 17.3%, 2핵성화분 67.5%, 3핵성화분 20%로 구성되어 있었고 '목포 68호'는 2핵성화분 92.3%, 3핵성화분 7.7%로 구성되어 있었다(Fig. 1F). '목포 111호'의 경우는 2.0-2.5 mm의 크기로 신장되면서 4분자기 50%, 1핵기 초기 35.7% 및 중기 14.3%로 이루어져 있었으며, 3.0-3.5 mm의 크기에서는 1핵기 중기 15% 및 말기 75%의 비율로 구성되고 있었으며 1핵기말기가 다수를 차지하고 있었다. 3.5-4.5 mm까지의 화뢰의 크기에서는 2핵성화분과 3핵성 화분만으로만 구성되어 있었다. 'MS-B Line'의 경우는 2.5-3.0 mm 크기에서도 4분자기가 관찰되어 초기 발육상태가 조금 늦게 일어나는 것을 볼 수 있었다. 화뢰가 3.0-3.5 mm 크기로 신장되면서 1핵기초기 13%, 중기 62.3% 및 말기 24.7%의 비율로 구성되어 있었다. 3.5-4.0 mm의 크기로 진전되면서 1핵기말기의 소포자들이 65.3%로 다수를 차지하고 있었으며, 화뢰의 크기가 4.0-4.5 mm일 경우에는 2핵성화분(76.4%)과 3핵성(23.6%)로 구성되어 있었다(Table 1).

이와 같이 국내 육성 유채의 품종에 따라 화뢰의 크기가 같아도 화분 내의 핵 발달단계가 서로 다름을 확인할 수 있었으며, '탐라유채'의 경우는 다른 품종에 비해 서서히 화분 발육이 되었던 것으로 판단되며 목포 계통의 경우, 비록 같은 계통일지라도 2.5 mm 이상 크기에서부터 서로 다른 발달 단계의 양상을 보였다. 이는 소포자 배양시 배발생에 영향을 주는 요인으로 작용할 것으로 생각되며, Chuong *et al.*



**Fig 1.** The development of microspores between two genotype of winter type 'Mokpo 68<sup>#</sup>' and 'Tamrayuchae' *in vivo*. A, Microspores of tetrad stage found in buds of below 2 mm. B and G, Microspores of early uninucleate and tetrad stage found in buds of 2.0-2.5 mm. C and H, Microspores of early, mid and late uninucleate stage found in buds of 2.5-3.0 mm. D, The most of late uninucleate stage found in buds of 3.0-3.5 mm (M) and I, Microspores of mid and late uninucleate stage found (T). E, Microspores of late uninucleate stage and binucleate stage found in buds of 3.5-4.0 mm (M) and J, The most of late uninucleate stage found (T). F and K, Microspores of binucleate and trinucleate stage found in buds of 4.0-4.5 mm (M, T).

(1988)이 donor plant의 각 개체간의 유전적 배경이 다르기 때문에 genotype 및 개체간에 큰 차이가 있다고 보고한 것이나, Thurling & Chay(1984)가 화퇴의 크기와 소포자 발육간의 관계에서 환경적인 요인과 품종에 따라 차이가 있음을 보고한 것과는 일치하는 경향이였다.

한편, Keller *et al.*(1975)은 *B. campestris*를 재료로 하여 반수체 배생산을 위해서는 소포자 발육이 1핵기의 시기가 효과적이라고 보고하였다. 그러나 소포자 배양 시 배발생 효율이 높은 1핵기말기의 소포자들을 분리해 내는 최적의 화퇴 크기는 각각의 품종에 대하여 정확하게 구분 짓기에 어려움이 있기 때문에 품종에 따른 생체 내의 소포자발육시기를 구명하는 것이 중요하다고 생각되었다.

Jang *et al.*(1997)은 생체 내에서 춘파형과 추파형 품종 간 소포자의 발육정도를 비교해 본 결과, 춘파형인 'Lisandra'는 화퇴 크기가 3.4-3.7 mm 크기까지 도달하여도 소포자들의 대다수가 1핵기말기로 이루어져 있으며, 4.2 mm 이상인 크기에서도 적은양의 1핵기말기의 소포자가 포함 되어 춘파형과 추파형 품종 간에 배생산 효율에 차이가 있음을 지적하였다. 반면, 추파형 품종들에서는 3.0-3.5 mm 크기에서는 1핵기말기와 2핵기초기의 소포자들로 이루어져 있고, 3.5-4.0 mm 크기에서는 2핵기화분과 극소수의 3핵기화분으로 구성되어 있었다. 결과적으로 외관상으로는 같은 크기의 화퇴일지라도 춘파형인 'Lisandra' 품종은 소포자의 발육이 천천히 진행되는 반면에 추파형 품종들은 빠른 속도로 소포자의 발육이 진행되고 있음을 알 수 있었다. Ohkawa *et al.*(1987)은 *B. napus*의 춘파형 품종이 추파형에 비해 소포자 유래의 배생산이 현저하게 높은 것은 생체 내에서 소포자 생육속도가 다르기 때문에 배발생에 영향을 준다고 하였다. 그러므로, 반수체 생산을 위한 소포자 배양 시 배발생 효율을 높이기 위해서는 비록 재배환경이 같은 품종일지라도 화퇴 크기에 따라 생체 내의 소포자 발육상태가 다르므로 각각의 품종에 따른 화퇴의 크기와 소포자 발육 상태를 확인하여 최적의 소포자 배양 시기를 확립하는 것이 가장 중요하다고 하겠다.

**적 요**

국내 재배 유채의 육종을 위해서는 소포자배양을 통한 배발생법의 확립이 절실하나 대부분의 재배 품종이 배발생율이 낮고 품종별로 화퇴의 크기에 따른 소포자의 발달 상태가 다르기 때문에 이에 대한 조사가 반드시 필요하다. 따라서 본 연구에서는 국내 육성 유채 품종의 육종을 위한 기초 자료

로서 품종 간 화뢰의 크기에 따른 생체 내 화분(핵)발육 상태를 비교, 관찰하였다.

1. 소포자 배양에 있어서 배 발생이 가능한 소포자 분리 시기는 1핵기말기 또는 2핵기초기가 효과적이며, 소포자 배양에 최적인 화뢰의 크기는 품종에 따라 차이가 있지만 3.5-4.0 mm이다.

2. 예외적으로 ‘탐라유채’는 3.5-4.0 mm의 크기에서 다수의 1핵기말기의 소포자와 2핵기초기의 소포자가 관찰되었으며, 화뢰크기가 더 큰 4.0-4.5 mm 크기에서도 2핵기초기의 핵이 관찰되어 화분발육상태가 늦게 진행되는 것을 알 수 있었다.

3. ‘목포64호’의 경우 3.0-3.5 mm 크기에서 1핵기초기와 1핵기중기 및 1핵기 말기의 소포자들이 관찰되었으나 다른 품종과 달리 2핵기 화분이 전혀 관찰이 되지 않았다. ‘MS-B Line’의 경우는 2.5-3.0 mm 크기에서도 4분자포자가 관찰되어 초기 발육상태가 조금 늦게 일어나는 것을 볼 수 있었다.

### 인용문헌

- Chuong, P. V., and W. D. Beversdorf. 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. *Plant Sci.* 39 : 219-226.
- Chuong, P. V., C. Deslauriers, L. S. Kott, and W. D. Beversdorf. 1988. Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus*. *Can. J. Bot.* 66 : 1653-1657.
- Coleman, A. W., and L. J. Goff. 1985. Applications of fluorochromes to pollen biology. I. Mithramycin and 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as vital stains and for quantitation of nuclear DNA. *Stain. Technol.* 60 : 145-154.
- Jang, Y. S., K. S. Min, Y. B. Oh, D. H. Chung, and J. H. Park. 2000. Comparisons of Pollen Development *in vivo* and *in vitro* Culture between Spring and winter Rapes. *Korea J. Breed.* 32(2) : 179-185.
- Jang, Y. S., K. S. Min, Y. B. Oh, and D. H. Chung. 1997. *In vitro* Embryogenesis of Haploids from Isolated Microspores of Oil Seed Rape (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*). *Korean J. Breed.* 29(4) : 474-479.
- Keller, W. A., T. Rajhathy, and J. Lacapra. 1975. *In Vitro* production of plants from pollen in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Reports.* 8 : 584-597.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. pflanzenphysiol.* 105 : 427-434.
- Ohkawa, Y., K. Nakajima, and W. A. Keller. 1987. Ability to induce embryoid in *Brassica napus* cultivars. *Jpn. J. breed.* 37 (supp.2) : 44-45.
- Pechan, P. M., and W. A. Keller. 1988. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 74 : 377-384.
- Thurling, N. P., P. M. Chay. 1984. The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Ann. Bot.* 54 : 681-693.