

## 藥培養 由來 녹색꽃양배추(Broccoli)의 幼植物 馴化 및 倍數性 調査

李光植\* · 朴載福<sup>1</sup> · 安春姬 · 尹汝重<sup>2</sup>  
草原種苗社, <sup>1</sup>서울市立大學校, <sup>2</sup>오운바이텍

### Polyploidy and Acclimatization Rate of Broccoli Plants Derived from Anther Culture

LEE, Kwang Sik\* · PARK, Jae Bok<sup>1</sup> · AHN, Chun Hee · YOON, Yeo Joong<sup>2</sup>

Chowon Seed Co., Kongju, Chungnam, 314-830, Korea: <sup>1</sup>Dept. of Environ. Hort., Univ. of Seoul, Seoul, 130-743, Korea: and  
<sup>2</sup>OhyoonBiotech. Co., Kongju, Chungnam, 314-830, Korea. \*Corresponding author

This study was conducted to clarify the acclimatization rate and ploidy level of anther culture-derived plants in broccoli. The acclimatization rate from 71.4 to 100% was obtained from 7 varieties in 2 years. It was possible to identify the ploidy of the plants obtained through anther culture by measuring the number of chloroplast in the guard cell. The average numbers of chloroplasts per guard cell in haploid, diploid, and tetraploid were 8.5, 13.5 and 18.5, respectively. The regenerated plants could be classified based on these results into 47.1~51.3% of haploids, 47.9~51.7% diploid, and 0.8~1.2% of tetraploids.

key words; chloroplast counting, ploidy leael

作物의 育種過程中 選拔과 固定의 重要성과 困難性은 相同染色體의 相異한 遺傳子 組成에 따른 雜種遺傳子組合에 起因된다고 할 수 있다. 半數體는 劣性遺傳子の 發現에 따라 後代檢定이 불필요하며 染色體 倍加에 의해 當代에 純種으로 固定시킬 수 있는 長點을 지니고 있다. Bergner(1921)가 *Datura stramonium*에서 半數體를 발견한 이래 處女生殖, 童貞生殖, apogamic 半數體, semigamy, pseudogamy, paraandrogenetic haploid, somatic meiosis, apomixis, 遲延수분, 染色體缺失(*Hordeum bulbosum*) 등 여러가지 半數體 誘起方法이 研究되어 왔으나 效率이 낮은 점과 適用可能性이 몇몇 種에 局限되어 있어 制約을 받아 왔다. 藥培養은 生殖生長 中 小孢子의 一部가 花粉으로 發達하지 않고 個體發生을 함에 따라 半數體 또는 自然倍加에 의한 倍數體의 發生을 가능케 하는데 지금까지 40餘科 260餘種 以上の 식물에서 半數體 callus나 식물체를 획득하였음이 보고되어 植物에 있어서 一般的인 현상으로서 받아들여지고 있다.

녹색꽃양배추(broccoli)의 慣行育種方法은 장기간에 걸친 內婚系 育成때문에 一代雜種品種育成에 많은 노력과 시간이 요구되어 왔다. 따라서 단기간에 半數體를 育成하여 染色體 倍加를 통한 純系를 作出하여 品種을 育成하려는 노

력이 여러 연구가에 의해 연구되어 왔다(Arnison et al., 1990 : Arnison et al., 1990 : Keller et al., 1983 : Wang et al., 1992 : Yang et al., 1992). 그러나 藥培養이 成功하였다 할지라도 실제 育種에 이용하기까지는 해결되어야 할 先決問題가 많이 남아 있다.

藥由來 植物體들이 眞正 半數體性 雄性 生殖細胞 기원으로 遺傳的 純系性이 인정되어야 하며, 藥培養에 의하여 半數體 식물의 유도가 용이하여야 하고, 그 誘起率도 높아 藥由來 식물체 集團內에서 多樣性이 있어야 한다. 또한 획득된 半數性 植物의 體系的이고 安定的인 倍數性化가 가능해야 하며, 이렇게 획득된 식물이 器內培養이나 倍數性化 過程中에서 발생할 수 있는 遺傳的 變異에서 安定的이어야 한다.

본 실험은 藥培養으로부터 誘起된 半數體植物을 品種育成에 원활하게 이용할 수 있는 가를 檢討하기 위하여 *in vitro* 培養 동안에 發生할 수 있는 遺傳的 變異性의 程度를 조사하고, 培養중 染色體가 自然 倍加된 比率에 미치는 환경요인을 조사하고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 葯由來 植物體의 馴化

正常的으로 本葉이 3~4매 展開되고 發根된 葯由來 植物體를 vermiculite와 perlite를 2 : 1로 혼합하여 넣은 6cm × 6cm 연결꽃트에 채운 뒤 2~3시간 底面灌水한 다음 서늘한 장소에서 5~6시간 수분을 蒸發시킨후 品種別로 라벨 표시하여 移植하였다.

器內植物의 이식 초기에는 空氣濕度を 높여 活着이 잘되도록 크린랩(LLD-PE)으로 완전 密封한 다음 점차 조금씩 공기가 循環되게 管理하였으며, 新葉이 나오고 완전 활착되어 馴化된 植物體는 網室에 옮겨 定植하였다.

### 葯由來 植物體의 倍數性 調査

배추科 葯由來 植物體의 個體別 染色體 검정으로 倍數性을 판단하는 것은 어려운 작업이다. 그러므로 빠르고 간편한 倍數性 早期 判斷方法으로 孔邊細胞의 크기 孔邊細胞內의 葉綠體數(Figure 1)의 조사가 Woo 등 (1991) 및 Yoon 등 (1992)에 의해 실시된바 있다. 본연구는 이들의 방법과 植物體의 花粉形態, 花粉量, 外形의 特性을 並行 調査하여 倍數性을 判斷하였다.

특히 孔邊細胞內의 葉綠體數 調査에서는 Sass (1971)가 옥수수의 waxy starch를 染色하는데 사용했던 옥도 옥도칼리용액[iodine(I<sub>2</sub>) 2g, KI 1g/97mL(D.W.)]으로 시료 採取 후 즉시 染色하여 검정하는 方法을 택하였다. 즉, 시료 採取 즉시 slide glass에 옥도옥도칼리용액 한방울을 떨어뜨린 후 表皮組織의 外皮가 서로 겹치지 않도록 놓고 cover glass를 덮은 다음 光學顯微鏡을 사용하여 400배로 관찰, 조사하였다.

馴化 과정중에 發根된 幼根 先端을 오전 10시전에 採取하여 0.1% colchicine 水溶液에 침지시켜 室溫에서 4시간 동안 前處理한 다음 滅菌水로 충분히 水洗한후 acetic-alcohol에 固定하여 室溫에서 1주야(over-night)를 보낸 후 다시 固定液을 滅菌水로 충분히 씻어내고 鹽酸-醋酸 解離液(1N HCl : 45% acetic acid = 2 : 1)에서 약 10분간 解離시켰다. 染色體의 觀察은 lacto-propionic orcein으로 染色하여 觀察하였다.

## 결과 및 고찰

### 葯由來 植物體의 馴化率

一代 雜種 5 品種을 이용한 제 1년차와 7品種을 이용한 2년차의 葯培養에서 획득한 식물 的 馴化結果를 Table 1, 2에 나타내었다.

1년차의 5 品種에대한 葯由來 獲得개체의 평균 馴化率은 83.6%였고, 葯由來 個體의 馴化率이 가장 높은 品種은 'Marathon'으로 100%였으며 가장 낮았던 品種은 'Mariner'로 71.4% 였다(Table 1).

**Table 1.** Varietal difference in acclimatization rate of anther-derived plantlets in *Brassica oleracea* var. *italica* in 1991.

Cultivars	No. of cultured embryos(A)	No. of plantlets regenerated (B)	B/A % acclimatized	No. of plantlets (C)	C/B %
Mariner	17	14	82.5	10	71.4
Marathon	10	5	50.0	5	100.0
Landmark	72	48	66.7	38	79.2
Zeus	16	14	87.5	12	85.7
Arcadia	36	27	75.0	22	81.5
mean	30.2	21.6	72.3	17.4	83.6

또한 2년차(1992년)의 7品種을 이용한 葯由來 植物體의 平均 馴化率은 85.1%로 1년차(1991년) 성적보다 1.5% 높았으나 품종내에서의 年차간 變이가 있는 것으로 확인 되었다. 이러한 年차변이의 原因에 대해서는 좀더 精밀한 검토가 필요하다. 2년차(1992) 實驗에서 葯由來 植物體의 馴化率이 가장 높은 品種은 'Landmark'로 100%였으며 가장 낮은 品種은 'Greenbelt'로 76.4%로 나타났다(Table 2). 배추 一代 雜種 6品種을 이용한 葯由來 植物體 馴化 實驗에서 馴化率이 가장 높은 品種은 36.7%, 가장 낮은 品種은 0.0%라는 Woo (1993)의 보고와 비교하여 볼 때 양배추류인 녹색꽃양배추는 馴化率이 높은 種이라는 것을 시사하고 있다. 순화 과정이 특히 뿌리에 의한 양,수분의 흡수능력과 잎줄기에서의 증산 사이의 균형이라는 점을 감안할때, 녹색꽃양배추는 다른 배추科 作物인 무, 배추에 비하여 子葉에서 급속히 엽록소를 갖는 조직이 발달하므로서 광합성작용이 활발하여 幼芽가 발육하기 위한 양분생리가 좋아 發根力이 良好하고, 또한 生育이 強하기 때문에 馴化率이 높았던 것으로 思料된다는 Fujime (1979)의 보고와 비슷하였다. 이러한 점이 단순히 생리적인 문제인지, 아니면 種 生態 내지 遺傳的인 문제인가는 좀더 精밀한 검토가 필요하다고 생각한다.

**Table 2.** Varietal difference in acclimatization rate of anther-derived plantlets in *Brassica oleracea* var. *italica* in 1992.

Cultivars	No. of cultured embryos(A)	No. of plantlets regenerated (B)	B/A %	No. of plantlets acclimatized(C)	C/B %
Mariner	69	48	69.6	38	79.2
Marathon	31	26	83.9	21	80.8
Landmark	5	4	80.0	4	100.0
Zeus	30	26	86.7	22	84.6
Greenbelt	250	182	72.8	139	76.4
Arcadia	48	37	77.1	33	89.2
Lancelot	7	7	100.0	6	85.7
mean	62.9	47.1	81.4	37.6	85.1

藥培養 植物體의 倍數性

적 요

孔邊細胞內 葉綠體數에 의한 葯由來 녹색꽃양배추의 倍數性을 보면 半數體들의 孔邊細胞內 葉綠體數의 分布가 4個에서 10個로 다양했으나 平均 葉綠體數는 8.0個였고, 二倍體들의 葉綠體數의 分布는 12個에서 16個로 平均 13.5個였다. 또한 四倍體들의 葉綠體數의 分布는 16~28개로 폭넓게 分布하였으나 平均 18.5개였다. 이들은 Woo 등 (1991)이 보고한 葯由來 배추에서의 倍數性 調査 結果와 類似하였다.

倍數性的 結果는 Figure 1 및 Table 3에서와 같이 半數體, 二倍體, 四倍體들이 나타났다. 1991年度 1年次에 誘起한 植物體에 대한 實驗에서는 二倍體가 51.7%로 가장 높았고 半數體가 47.1%, 四倍體가 1.2%였다. 그리고 1992年度 2年次에 誘起한 植物體에 대한 實驗에서는 半數體가 51.3%로 높게 나타났고, 二倍體가 47.9%, 四倍體가 0.8%의 비율을 보여 주어 半數體 二倍體가 각각 절반정도로 차지하였음이 확인되었다. 이는 Keller (1984)가 배추과의 경우 40~60%가 二倍體였다고 보고한 내용과 유사하였다.

약배양 유래 녹색꽃양배추의 幼植物 순화율 및 배수성을 조사 하였다. 7가지 공시 품종중 순화율에 있어 Marathon은 80.8~100%, Landmark는 79.2~100%, Mariner는 71.4~79.2%로 나타나 평균 순화율은 83.6%~86.1% 이었다.

小胞子 배에서 생성된 식물체의 倍數性は 孔邊細胞內 葉綠體數 측정으로도 가능했으며, 또한 倍數性的 조기측정을 위해 I-KI용액을 사용하여 葉綠體의 즉시염색 관찰이 가능했다. 관찰된 평균 葉綠體數는 半數體가 8.5, 2배체는 13.5, 그리고 4배체는 18.5개로 나타 났으며 이를 기초로 분류한 再分化개체의 倍數性은 半數體 47.1~51.3%, 2배체 47.9~51.7%, 4배체 0.8~1.2% 로서 반수체와 2배체가 각각 반씩이고 4배체가 극히 적게 분포하여 인위적인 염색체 배가 없이도 상당수의 자연 배가된 2배체를 얻을 수 있었다.

인 용 문 헌

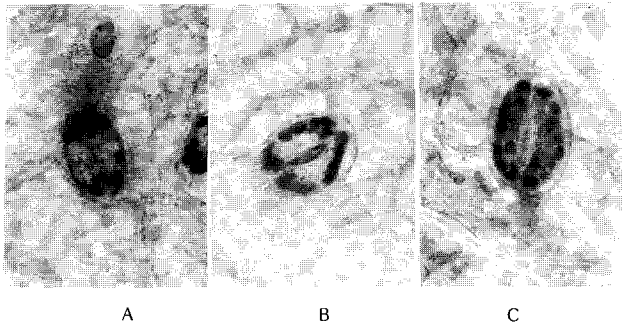


Figure 1. Chloroplasts in the guardcells of anther-derived plants of broccoli(×400).

A : Haploid      B : Diploid      C : Tetraploid

Table 3. Ploidy of anther-derived plants of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)

Cultavars	Year of inoculation	Number of plants observed			Total
		Haploid	Diploid	Tetraploid	
Mariner	1991	4	6	0	10
	1992	17	21	0	38
Marathon	1991	3	2	0	5
	1992	8	13	0	21
Landmark	1991	16	21	1	38
	1992	2	2	0	4
Zeus	1991	5	7	0	12
	1992	9	13	0	22
Greenbelt	1991	-	-	-	-
	1992	77	61	1	139
Arcadia	1991	13	9	0	22
	1992	18	14	1	33
Lancelot	1991	-	-	-	-
	1992	4	2	0	6
sub-total	1991	41 (47.1%)	45 (51.7%)	1 (1.2%)	87
	1992	135 (51.3%)	126 (47.9%)	2 (0.8%)	263
Total		176 (49.2%)	171 (49.8%)	3 (1%)	350

Amison PG, Donaldson P, Jackson A, Semple C, Keller WA (1990) Genotype specific response of cultured broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) anthers to cytokinins. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 20:217-222

Amison PG, Donaldson P, Hoh LCC, Keller WA (1990) The influence of various physical parameters on anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 20:147-155

Fujime Y (1979) Characteristics as the broccoli plants. *Agriculture technique 「great line by the vegetables 6」* pp 3-47 Nosan gyoson bunka kyokai, Tokyo

Keller WA (1984) Anther culture of *Brassica*. In: Vasil IK(ed) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol. I pp 302-310 Academic Press

Keller WA, Armstrong KC, dela Roche AI (1983) The production and utilization of microspore-derived haploids in *Brassica* Crops. In: Sen Sr and Giles KL (eds.). *Plant cell culture in crop Improvement*, pp 169-183 Plenum, New York

Sass EJ (1971) *Botanical microtechnique*. The Iowa State Univ. Press pp 96

Wang HM, Wager GM, Yang YL (1992) Embryogenesis in anther and pollen culture of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Acta Agriculturae Boreali Sinica* 7: 61-72

Wardle K, Dobbs EB, Short KC (1983) *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J Amer Soc Hort Sci* 108:386-389

Woo JG (1993) Studies on the factors affecting efficiency of anther culture and phenotypic characteristics in anther - derived progeny in chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). Seoul Nat Univ. Ph D Rept

Woo JG, Kim HD, Oh BS (1991) Estimation of the ploidy of anther

derived chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) by the number of chloroplasts in the guard cells. Res Rept RDA(H) 33: 35-39

**Yang Q, Chauvin JE, Herve Y** (1992) Androgenic embryos obtained by in vitro culture of broccoli flower bud (*Brassica oleracea* var. *italica*). Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Series 3, Sciences de la vie 314: 147-152

**Yoon YJ, Eun JS, Lee KS** (1992) Anther culture and its utilization in breeding of *Capsicum annuum* L. Chonbuk Nat Univ Research of Farm Village Society pp 43-65

(1998년 3월 27일 접수)