

## 器内 受粉과 培養에 의한 禾本科 飼料作物 種屬間 受精과 胚의 發育

李 浩 鎮\* · 韓 智 然\*

## Fertilization and Embryo Development in Pollination and Culture for Interspecific and Intergeneric Crossing of Forage Crops

Ho Jin Lee\* and Ji Yeon Han\*

### ABSTRACT

The ovaries or the ovules of grasses were pollinated and cultured *in vitro* to raise the interspecific or the intergeneric hybrids between tall fescue, meadow fescue, and Italian ryegrass. The isolated and surface-sterilized pistils were dusted with compatible pollens on stigma, on stump after removing stigma, or on excised ovule. Furthermore, the fertilized ovaries and ovules were cultured on MS, M6, or White's media and treated with plant growth regulators: IAA, kinetin, BA to promote embryo development and seed maturity.

The *in vitro* fertilization in grass species ranged from 44 to 92% depending on ovary and pollen parents. The stigmatic pollination was resulted in 67.8% fertilization, the stump pollination 89.0%, and the excised ovule pollination 61.0%, respectively. White's medium was the most effective to provide embryo development and seed maturity in grass species. And the combined treatment of IAA 10mg/l, kinetin 0.2mg/l, was better than the non-treatment. Only two seedlings, one complete and one abnormal with root formation were obtained from 127 ovaries cultured. The anatomy of ovules *in vitro* cultured was revealed the differentiation of vascular system and meristematic tissue, and the formation of sclerenchyma cells inside ovule.

### 緒 論

交雜育種은 새로운 品種을 育成하는데 크게 貢獻하여 왔다. 그러나 近緣種끼리의 交雜에서는 비슷한 形質들만이 反復하여 構成되는 偏向性이 나타나 새로운 遺傳形質의 構成이나 特異形質의 導入이 制限되어온 반면 種間이나 屬間과 같은 遠緣交雜間에는 交雜不稔이나 不和合性 때문에 자유로운 交雜이 抑制되어 왔다. 遠緣植物들간의 交雜의 어려움은 混交를 防止하는 保護裝置로서는 중요하지만 作物改

良의 한 制限要因이 되고 있다.

이러한 制限要因을 克服하기 위한 方法으로 細胞融合이나 培養技法들이 研究開發되어 담배, 당근, 페튜니아 등의 植物에서는 많은 성과를 거두고 있으나 花粉과나 두과작물의 細胞나 組織培養으로 完全한 植物體의 再分化는 解決하여야 할 課題로 남아 있다.

특히 生殖器官인 子房이나 胚珠 또는 胚를 利用하여 器内 狀態에서 受粉을 實施하고 培地에서 培養시켜 植物體를 얻으려는 試圖는 담배,<sup>1)</sup> 카아네이션이나 페튜니아<sup>15)</sup>에서 성공시킴으로써 種間交雜의

\* 서울대학교 農科大學 (Dept. of Agronomy, Seoul National University, Suwon 170, Korea) <87. 12. 10 接受>

不適合性を克服할 수 있는 가능성을提示하여 주었다. 最近에는 옥수수의 雌絲에 花粉을 묻혀 胚珠를 수정시켜서 5%의 種子形成을 얻었으며 그중 70%가 發芽되었다고 보고하였다.<sup>5,6)</sup>

飼料作物에서는 이미 오래전부터 種間 屬間作物들이 育成되어 왔으며 그중 Sudan-sorghum Hybrid는 주요 靑刈作物로서 栽培되고 있다. 많은 種의 飼料作物들은 他家受粉을 주로 하며 多倍數體가 흔히 나타나므로 遠緣種間 交配에서 雜種後代를 얻을 가능성이 比較的 높다. 本 研究에서는 草本性 飼料作物인 *Festuca* 屬의 토올페스큐, 메도우페스큐와 *Lolium* 屬의 이탈리아라이그라스들 간에 種間, 屬種雜種을 얻기 위하여 기내수분을 實施하였고 受粉方法에 따른 受粉率을 調査하였다. 또한 受精된 胚珠들을 서로 다른 培地에서 成熟시키고서 發育狀態를 比較하였고 生長調節物質의 效果를 調査하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 種屬間 受粉方法

禾本科 飼料作物 중에서 토올페스큐(*Festuca arundinacea* L. var. Cosmos)와 이탈리아라이그라스(*Lolium multiflorum* L. var. Tetrone)를 供試하여 種間, 屬間 器內受粉을 하였으며 受粉組合은 다음과 같이 하였다.

受粉組合	子房親	花粉親
A	tall fescue	X meadow fescue
B	tall fescue	X Italian ryegrass
C	meadow fescue	X tall fescue
D	meadow fescue	X Italian ryegrass
E	Italian ryegrass	X tall fescue
F	Italian ryegrass	X meadow fescue

### 2. 表面消毒

圃場에서 採取한 이삭이나 花器들은 小穗 또는 小花들로 分離하였다. 禾本科의 小穗들은 各 穎花別로 잘라내고 Campbell<sup>2)</sup>의 方法에 따라 70% EtOH에 1分間 沈漬시킨 後 蒸溜水에 1分間 담그어 씻어낸 다음 3%의 차아염소산소다(NaOCl)에 5分동간 침지시킨 後 蒸溜水로 1分間 씻어 주었다.

穎花들의 外穎과 內穎을 열고 子房과 수술들을 3% NaOCl에 약 10초동안 담갔다 다시 蒸溜水

에 씻어 器內受粉에 사용하였다.

### 3. 器內受粉方法

實驗室에서 다음과 같은 人工受粉 方法들을 實施하여 이를 比較하였다.

(1) 柱頭受粉: 表面消毒을 끝낸 禾本科의 穎花들의 內穎과 外穎을 핀셋으로 열고 子房을 分離하고 花粉親에서 모은 花粉을 묻혀 준 다음 受精用培地에 置上하였다.

(2) 柱頭除去受粉: 禾本科의 깃털형인 2개의 柱頭를 잘라내고 그 절단면에 花粉親에서 모은 花粉을 묻혀 受精用培地에 置上하였다. 荳科의 알팔파는 柱頭를 잘라내고 切斷部에 花粉들을 묻혀 受精用培地에 置上하였다.

(3) 胚珠受粉: 해부현미경 밑에서 禾本科 子房의 上部 및 側部를 자르고 약간씩 壓力을 가하여 胚珠를 칩출시켰고<sup>9)</sup> 나출된 胚珠들은 유리슬라이드 위에 모아 둔 화분위에 굴리어 화분을 충분히 묻친 후에 受精用培地에 잠기도록 置上하였다.

### 4. 培地造成

培地들은 受精用과 胚發生用으로 나누어 제조하였다. 受精用은 授粉을 한 子房이나 胚珠를 심어 受精이 完了될 때까지 약 5日間 使用하였고 그 후는 胚成熟用 培地로 옮겨 培養하였다. 受精用 培地는 禾本科는 N6培地에 8%의 sucrose를 包含시킨 固型배지를 使用하였다. 胚成熟用 培地는 受精用과 同一한 培地였으나 sucrose의 濃度를 5%로 하였으며 試驗管에 담아 消毒한 後 한개의 試料를 옮기고 알루미늄포일로서 密封하였다.

일단 受粉을 實施한 子房이나 胚珠들은 室溫의 暗狀態로 5日間 維持하였다가 生長床에서 晝間 26℃(16時間), 夜間 22℃(8時間)로 培養하였다. 또 必要한 時期마다 同一 造成의 培地에 移植하여 繼代培養을 實施하였다.

### 5. 胚의 成熟과 發生에 미치는 培地種類와 植物호르몬

受精이 끝나고 胚의 成熟이 시작된 子房이나 胚珠들의 生長은 培地들의 무기성분의 造成에 따라 影響을 받게 된다. 既存의 研究들에서 흔히 使用되어 온 N6培地, MS培地, White's培地들을 각각 만들고 糖의 濃度는 5%인 한천배지를 제조하였다. 成熟中인 子房들을 이들 培地에 移植하고 30餘日經

過된 뒤 그들의 生長狀態를 評價하였다. 完熟된 胚의 크기와 外部 色澤을 고려하여 各 試料들의 成熟狀態를 1~10 까지의 相對值로서 表示하였다.

胚의 成熟에 影響하는 植物호르몬의 效果를 비교하기 위하여 IAA(Indole acetic acid), BA(6-benzylaminopurine), kinetin 들을 濃度別로 培地에 添加하여 培地種類 比較와 同一한 方法으로 評價하였다.

### 6. 解剖構造의 試料操作과 觀察

禾本科의 花器, 受精과 胚의 發生過程을 形態組織學的으로 觀察하기 위하여 花器構造를 解剖현미경으로 檢鏡하였고 成熟中인 子房과 胚들을 固定하여 현미경 슬라이드로 제작하였다. 子房이나 胚의 試料를 3% glutaraldehyde 용액으로 1次 固定하고 2% osmium tetroxide 로서 再固定한 뒤 acetone series 로서 脱水하였다. 이들 試料들은 Spurr resin으로 包埋하여 LKB ultramicrotome 으로 0.5~1 μm 두께의 section 들을 만들고 유리슬라이드 위에 附着시키고 toluidine blue O으로 染色하였다.

組織들은 Swift 光學현미경으로 檢鏡하였고 必要한 部位는 撮影하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 受粉方法에 따른 受精率

대부분의 禾本科 飼料作物들과 같이 토울페스큐, 메도우페스큐, 이탈리아안라이그라스들도 他家受粉을 주로 하고 n = 7인 基本 染色體들로 이루어져 있다. 따라서 이들 間의 人工交雜은 실제 많이 이루어져 왔고, 토울페스큐와 이탈리아안라이그라스의 屬間 交

雜이 育成되었고 各 作物種들의 多倍數體인 autotetraploids 들이 알려져 있다.<sup>1,3)</sup> *Festuca* 屬과 *Lolium* 屬 作物들 間의 人工交配에서 雜種을 얻을 確率は 圃場條件에서 7.6~10%程度로 낮으며<sup>17)</sup> F<sub>1</sub> 植物의 稔性的 缺乏으로 利用이 어려운 실정이다.

이들 作物의 花器에서 子房을 분리하고 花粉을 묻혀 *in vitro* pollination 을 實施한 뒤 培地上에 培養하여 種子를 얻는 것은 生體의 人工受粉에 比하여 더욱 용이한 方法인지 모른다. 왜냐하면 多數의 研究들에서<sup>7,16)</sup> 밝혀진 것과 같이 異種間交配의 경우 花粉의 發芽와 花粉管 伸長이 저지되거나 受精過程에서 不和合性이 일어나기 쉬우며 일단 受精이 되더라도 점차 子房內에서 新生胚의 退化가 進行된다. 이러한 경우 花粉發芽를 抑制하는 物質이 存在하는 柱頭를 除去하거나 *in vitro* pollination 을 實施하면 效果的인 胚成熟으로 誘導될 可能性이 높기 때문이다.

本 實驗에서 實施한 *in vitro* pollination 方法들의 受精結果는 表 1과 같이 나타났다. 受粉을 實施한 뒤 2주 후에 未受精된 子房은 크기가 變하지 않고 外部의 색깔이 褐色 또는 黑色으로 退化된 반면 受精된 子房들은 크기가 2배 가량 자라고 外部의 색깔도 연한 미색에서 연초록으로 變하였다(表 1).

이들 作物 種屬間의 柱頭受粉은 Tf × Mf 와 Mf × Tf의 交配組合에서 50% 以下の 낮은 受精率을 보였으나 그밖의 組合들은 모두 80~90%에 이르러 이들 間의 受精은 큰 문제가 아닌 것으로 나타났다. 토울페스큐와 메도우페스큐間의 낮은 受精率도 柱頭를 除去시키고 受粉시켰을 때에는 85% 이상으로 크게 向上되어 이들 깃털모양의 柱頭에는 花粉發芽를 抑制하는 不和合性的 傾向이 있는 것으로

Table 1. Percentage of fertilization by *in vitro* pollination methods in crossing of *Festuca* and *Lolium* genus.

Pollination crossing	Stigmatic	Stump	Excised ovule	$\bar{X}$
A: Tf x Mf	17.0%	90.5%	25.0%	44.2%
B: Tf x Ir	81.3	89.3	68.4	79.7
C: Mf x Tf	40.0	85.7	57.7	61.1
D: Mf x Ir	88.2	92.1	64.7	81.7
E: Ir x Tf	83.2	85.3	65.0	77.9
F: Ir x Mf	97.2	95.1	85.2	92.5
$\bar{X}$	67.8	89.0	61.0	

Tf: Tall fescue, Mf: Meadow fescue, Ir: Italian ryegrass

보여진다.

胚珠의 受粉은 柱頭除去受粉보다 훨씬 낮은 61%의 水準이었는데 이 方法은 解剖현미경 밑에서 子房속에 감추어져 있는 胚珠를 척출하는 解剖作業의 어려움 때문이었다. 外部의 子房壁을 자르고 壓力을 가하여 胚珠를 척출할 때 胚珠가 分리가 되지 않는 데다가 해부도의 使用이 胚珠에 상처를 주기 쉽고 또 연약한 胚珠의 組織이 外部의 培養條件에 잘 適應하지 못하였기 때문이었다. 禾本科의 胚珠의 척출 작업은 高度의 熟練을 要求하며 보다 高倍率의 해부현미경이나 施設의 補完이 이루어진다면 成功率을 크게 向上시킬 수 있을 것으로 보여지나 아직까지는 많은 時間과 勞力이 要求되는 作業이었다.

## 2. 培地에 따른 胚成熟과 發芽

토울페스큐와 메도우페스큐의 *in vitro* pollination 후 受精이 完了된 子房들을 서로 다른 培地에 培養하여 그들의 成熟 및 發芽를 調査한 結果는 表 2와 같다.

이들 培地中에서 受精胚의 成熟에 보다 效果的인 培地는 White's 培地로 나타났다. 馭나 他 禾本科에서 效果的인 것으로 報告된 N6 培地<sup>10)</sup>에 비해 White's 培地는 *Festuca* 屬의 種間雜種 胚의 培養에 있어 더욱 有利하였다. White's 培地는 他培地와 달리 無機鹽類의 含量이 一般의으로 낮은 것이 特徵이다. 옥수수<sup>11)</sup>의 *in vitro* pollination과 胚珠의 培養에 使用하였던 Raman (1980)의 BM 培地나<sup>14)</sup> Gengenbach의 RM 培地들<sup>6)</sup>을 고려할 때 胚珠의 培養에는 無機鹽類 濃度를 낮게 유지하고 한천의 濃度 역시 0.4% 程度로 낮추는 것이 適當할 것으로 보여진다.

受精 胚에서 正常的으로 育식물이 發生된 것은 N6 培地에서 한 개체였으며 馭리만 發生된 것은 MS 培地에서 한 개체였다. 그러나 이들의 發芽는 置上個體數가 소수였으므로 適正培地條件에 의한 正常的인 것으로 認定하기 어려웠다.

Table 2. Effects of culture media on ovule maturity and germination in *in vitro* pollinated tall fescue x meadow fescue.

Type of medium	No. of ovary cultured	Degree of maturity	No. of germinated plants	
			normal	abnormal
MS medium	45	6.9 ± 3.2	0	1
N6 medium	38	7.3 ± 2.5	1	0
White's medium	44	9.5 ± 0.8	0	0

## 3. 植物호르몬의 種類와 濃度에 따른 胚의 成熟과 發芽

토울페스큐와 이탈리안라이그라스의 屬間受粉에서 얻어진 受精 子房들을, N6 培地에 糖濃度를 3%로 添加한 한천배지에 IAA와 kinetin 濃度를 달리하여 培養한 結果는 그림 1과 같다.

胚의 成熟에 미치는 IAA의 效果는 10mg/ℓ까지는 濃度가 增加될수록 높게 나타났으며 kinetin의 效果는 0.2 mg/ℓ까지는 높았으나 IAA 보다는 크지 못하였다. IAA와 kinetin의 組合의 경우에는 (IAA 10 mg/ℓ) + (kinetin 0.2 mg/ℓ)에서 호르몬 無處理보다 33%가량 成熟度가 向上되었다. 한편 IAA와 BA 處理에서는 (IAA 0.2 mg/ℓ) + (BA 0.2 ~ 2 mg/ℓ)의 組合에서 他處理보다 약간 增加하는 傾向이었다 (Fig. 2). 그러나 이러한 植物호르

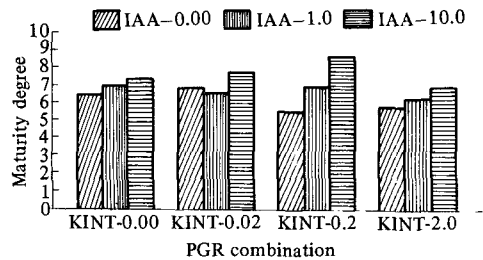


Fig. 1. Maturity of *Festuca* ovules cultured with treatments of IAA and kinetin.

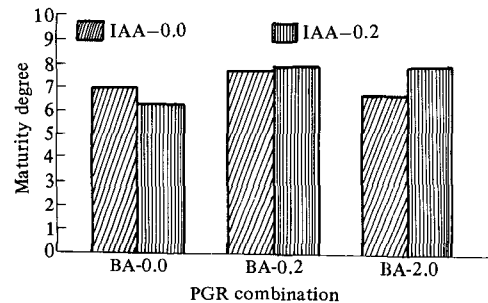
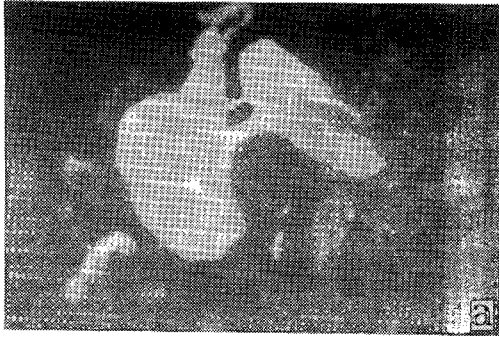
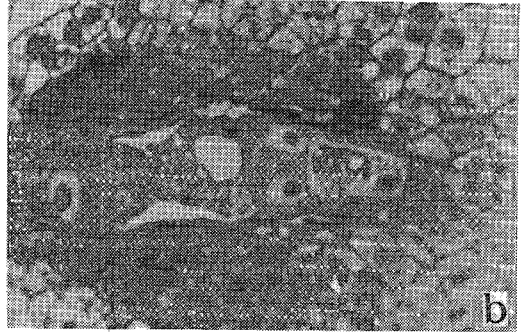


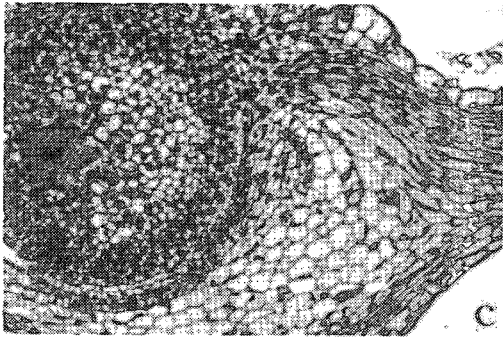
Fig. 2. Maturity of *Festuca* ovules cultured with treatments of IAA and BA.



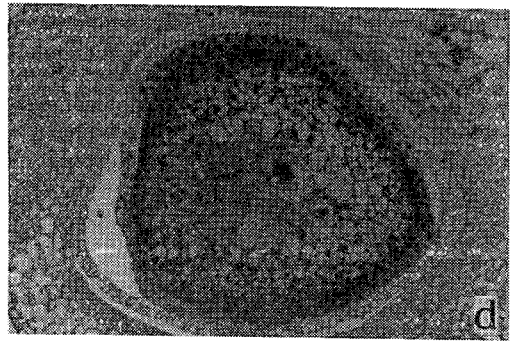
Excising out ovule from ovary, *Festuca arundinacea*.



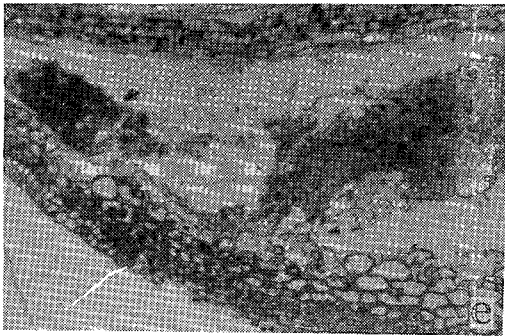
Embryo sac of *Lolium multiflorum*, Note egg nucleus, polar nucleus, and antipodal cells.



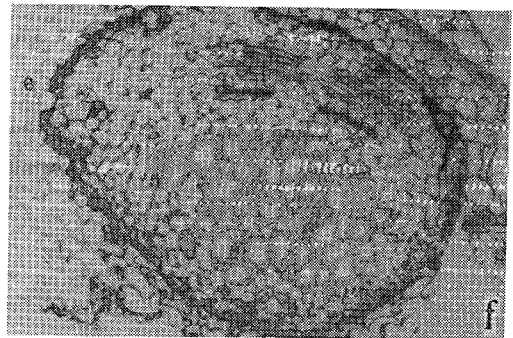
Longitudinal section of ovary, *Lolium multiflorum*. Note fusion of egg nucleus with sperm nucleus of *F. arundinacea*. Passage of pollen tube growth, at 4 hours after *in vitro* pollination.



Longitudinal section ovary, *Lolium multiflorum*, at 18 hours after *in vitro* pollination with pollens of *F. arundinacea*.



Longitudinal section of ovary 5 days after pollination, *Lolium multiflorum*, *in vitro* pollinated with *F. arundinacea*. Note development of embryo tissue (←) and endosperm.



Transverse section of 50 days old ovule, *in vitro* pollinated and cultured. Note differentiation of vascular system, and formation of sclerenchyma cells.

몬의 處理로도 正常種子로 성숙시키는데 미흡하였고 發芽에 이르지 못하였다.

既存의 報告들에는 胚와 種子의 成熟에 植物호르몬이 효과적이라는 결과들이 많지만 種類에 따라 매우 다양하였다. 옥수수 的 *in vitro* culture 에는 G-A<sub>3</sub>,<sup>4)</sup> 토올페스큐의 成熟 胚에서 칼루스를 유도하게

나,<sup>1)</sup> 未熟 穎花에서 半數體 식물을 키워내는 데는 2, 4 -D가 효과적이었고,<sup>2)</sup> 이탈리아 안라이그라스에서 는 BAP가 분얼발생을 촉진하였다.<sup>4)</sup> 일반적으로 胚 發生의 初期에는 Cytokinin의 고농도가 나타나고 細胞分裂을 촉진하는 역할을 하며 中期에는 Auxin과 GA의 농도가 증가하고 종자성숙 초기인 胚發生

後期에는 ABA의 농도가 증가하는 것으로 보여진다.<sup>13)</sup>

본 실험 IAA와 Kinetin의 조합처리가 胚發生과 成熟에 효과적이었음은 기대하였던 결과였으나 發芽로 유도할 수 없었음은 이들의 培養時 經時的 發生過程과 식물호르몬 및 영양성분 공급이 일치되어야 할 것으로 보여진다.

#### 4. 受精과 胚成熟 過程

이탈리안라이그라스의 柱頭に 토올페스큐의 花粉을 묻혀 MS 培地에 치상한 후 일정시간 별로 固定시키고 plastic에 包塊시켜 해부조직 연구에 사용하였다.

未受精된 성숙 胚珠에서는 두터운 珠心조직의 내부에 위치한 胚囊세포의 구조를 관찰할 수 있었다. 珠孔쪽으로부터 卵核세포와 2개의 核을 가진 極核세포, 그리고 合點(chalaza)쪽의 3개의 半促세포가 확인되었다. 受粉後 2시간이 경과된 珠頭와 子房 내부에서 胚珠로 향하는 花粉管的 伸長을 볼 수 있었으며 6시간이 경과되면서 受精이 완료되는 것으로 보여진다. 5일에는 胚珠의 내부에서 新生胚의 발육과 胚乳細胞의 核分裂이 일어나고 있었으며 Helobial endosperm型 胚乳形成을 나타내었다. 그러나 이 時期 이후부터 器內培養의 胚의 발육이 매우 지연되었고 胚乳의 발달이 부진하여 50일이 경과된 子房의 胚珠에서는 형태의 증대가 충분히 이루어지지 못하였다. 이들 胚珠의 斷面構造에서 維管束이 형성되었고 分裂組織이 존재함을 볼 수 있었으나 内部 胚乳부위에 厚膜細胞들이 생겨나고 皮層細胞들에 세포내용물들이 소진되어 退化現象을 관찰할 수 있었다.

이것은 新生 胚는 發生되었지만 胚의 發育이 지연되어 始原體의 分化가 정상적으로 일어나지 못하였고 胚乳組織 역시 형성되지 못하였음을 의미한다. 人工營養 培地에서 胚珠 또는 子房의 培養은 營養物質의 공급이 원활히 이루어지지 못하였거나 세포 분열 및 組織分化에 필요한 生長호르몬의 不在로서 胚의 發育이 미흡하였고 發芽個體를 얻기 어려웠던 것으로 판단된다.

#### 摘 要

*Festuca* 屬의 토올페스큐와 메도우페스큐, 그리고 *Lolium* 屬의 이탈리안라이그라스들 간에 種屬間 雜

種을 얻기 위하여 器內受粉과 器內培養을 實施하였다. 이들 作物들의 子房과 花粉을 採取하여 消毒을 하고 柱頭受粉, 柱頭除去 受粉, 胚珠受粉의 3가지 方法으로 器內受粉을 實施하였다. 그리고 이들의 胚發育狀態를 MS, N6, White's의 培地種類와 IAA, Kinetin, BA의 生長調節物質의 處理로서 比較하였다.

1. 토올페스큐, 메도우페스큐, 이탈리안라이그라스의 相互組合間 器內受粉에서 44~92%의 受粉率을 나타내었다. 이들의 柱頭受粉은 平均 67.8%, 柱頭除去 受粉은 平均 89%의 受粉率을 보였으나 胚珠受粉은 平均 61%로 낮았다.

2. 禾本科 受精胚珠에서 胚發育을 促進하는데는 White's 培地가 가장 效果의 이었고 植物生長調節物質의 處理는 IAA(10 mg/ℓ)와 Kinetin(0.2 mg/ℓ)의 混合處理가 無處理보다 效果的이었으나 發芽率은 極히 低調하였다.

3. 器內培養으로 成熟 胚珠의 解剖組織에서 維管束의 形成과 始原體組織의 分化를 確認할 수 있었으며 胚珠 内部에 厚膜細胞들의 形成이 觀察되었다.

#### 引 用 文 獻

1. Aung, T. and Evans, G. M. 1986. The potential for diploidizing *Lolium multiflorum* x *L. perenne* tetraploids. *Can. J. Genet. Cytol.* 27:506-509.
2. Campbell, C. T. and Tomes, T. D. 1984. Establishment and multiplication of red clover plants by in vitro shoot tip culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3:49-58.
3. Carnahan, H. L. and Hill, H. D. 1955. *Lolium perenne* L. x tetraploid *Festuca elatior* L. triploid hybrids and colchicine treatments for inducing autoallohexaploids. *Agron. J.* 47: 258-262.
4. Dalton, S. J. and Dale, P. J. 1985. The application of in vitro tiller induction in *Lolium multiflorum*. *Euphytica* 34:897-904.
5. Gengenbach, B. G. 1977. Development of maize caryopses resulting from in-vitro pollination. *Planta* 134:91-93.
6. Gengenbach, B. G. 1977. Genotypic influences on in vitro fertilization and kernel development

- of maize. *Crop Sci.* 17:489-492.
7. Kanta, K., Rangaswamy, N. S. and Maheshwari, P. 1962. Test-tube fertilization in a flowering plant. *Nature* 194:1214-1217.
  8. Kasperbauer, M. J., Buckner, R. C. and Springer, W.D. 1980. Haploid plants by anther-panicle culture of tall fescue. *Crop Sci.* 20:103-107.
  9. Ko, S. W., Wong, C. K. and Woo S. C. 1982. A simplified method of embryo culture in rice of *Oryza sativa*. *Bot. Bull. Academia Sinica* 24: 97-101.
  10. Lai, K. L. and Lie, L. F. 1986. Further studies on the variability of plant regeneration from young embryo callus cultures of rice plants (*Oryza sativa* L.) *Japan J. Crop Sci.* 55:41-46.
  11. Lowe, K. L. and Conger, B. V. 1979. Root and shoot formation from callus cultures of tall fescue. *Crop Sci.* 19:397-400.
  12. Marubashi, W. and Nakajima, T. 1985. Overcoming cross-incompatibility between *Nicotiana tabacum* L. and *N. rustica* L. by test-tube pollination and ovule culture, *Japan Breed.* 35:429-437.
  13. Quatrans, R. S. 1987. The role of hormones during seed development. In 'Plant' hormones and their role in plant growth and development. edited by P. J. Davies. 494-514 Martimus Nijhoff Publishers.
  14. Raman, K., Walden, D. B. and Greyson, R. I. 1980. Fertilization in *Zea mays* by cultured gametophytes. *J. of Heredity* 71:311-314.
  15. Rangaswamy, N. S. and Shivanna, K. R. 1967. Induction of gamete compatibility and seed formation in axenic cultures of a diploids self-incompatible species of *Petunia*. *Nature* 216: 937-939.
  16. Shivanna, K. R. 1982. Pollen-pistil interaction and control of fertilization. In *Experimental Embryology of Vascular Plants*, edited by B. M. Johri. 131-174. Springer-Verlag.
  17. 류종원 · 강정훈 · 박병훈 · 한홍전. 1985. 畜試報告書. 754 ~ 756.