

담배 식물체 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4)의

배수성에 따른 공변세포의 엽록체 수 변화

배창휴¹ · 이연희¹ · 양덕춘² · 민경수³ · 김호일¹ · 이효연^{4*}

순천대학교 농업과학연구소, ¹농촌진흥청 농업과학기술원 생물자원부,
²한국인삼연구소, ³전남대학교 농과대학, ⁴순천대학교 농업생명과학대학

Changes of Chloroplast Number per Guard Cell pairs of Leaves by Ploidy Level in *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4

BAE, Chang-Hyu · LEE, Yeon Hee¹ · YANG, Deok Chun² ·
MIN, Kyung Soo³ · KIM, Ho Il¹ · LEE, Hyo-Yeon^{4*}

Research Institution of Agricultural Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

¹National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon, 441-707, Korea

²Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon, 305-345, Korea

³College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

⁴College of Agricultural & Life Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

ABSTRACT We evaluated a possibility of the use of chloroplast number per guard cell pairs as a measure for ploidy level in the different ploidy levels of tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4). The guard-cell chloroplast numbers of leaves of haploid plant were a half of wild-type plant. Furthermore, the number of chloroplast per guard cell pairs of the leaves of doubled-haploid plant increased in two times compared with that of haploid plant. In addition, the chloroplast number was not changed in the F₁ progenies. The change of the chloroplast number by leaf stage was not observed. The results indicate that there is a strong relationship between ploidy level (2x and 4x) and chloroplast number per guard cell pairs. This relationship was also, observed in both *in vitro* and pot cultured plants. It was determined that the measurement of chloroplast number in guard cells of leaf epidermis is simple to use and less labour intensive, and hence can be considered a practical alternative to the chromosome counting methods or flow cytometry in the tobacco plant.

Key words: Diploid, flow cytometry, haploid, leaf stage

서 론

약배양을 포함한 배수성 식물체를 이용할 경우 후대에서 hemozygosity를 얻을 수 있기 때문에 양적·질적으로 유전되는 형질의 식물체 육종이 단시간에 가능하다. 따라서, 이러

한 장점은 엽색체를 배가시켜 품종을 육성하는 배수성 육종에 이용되고 있다 (Bridgen and Veilleux 1988; Cho et al. 1996; Koornneef et al. 1989; Lee et al. 1982; Miyoshi and Asakura 1996).

배수체를 배가시키거나 배수체를 육성할 경우 배수성을 판별하기 위해서 식물체 각각의 형태적 특징이나 엽색체 관찰, 세포 내 DNA의 양에 의한 분석방법이 지금까지 주로 사용되고 있다 (Galbraith et al. 1983; DE Laat et al. 1987;

*Corresponding author. Tel 061-750-3286 Fax 061-750-3208
E-mail hyoyeon@suncheon.suncheon.ac.kr

Miyoshi and Asakura 1996; Pinheiro et al. 2000; Sari et al. 1999). 담배에서는 주로 염색체 관찰에 의한 방법 (Bridgen and Veilleux 1988; Oh et al. 1994)으로 배수성을 판별하고 있다. 그러나 이 방법을 실제로 이용하고자 할 때 약간의 기술적인 문제와 노력이 따르기 때문에 간단하게 사용하는 것은 쉽지 않다. 지금까지 다양한 식물에서 잎에 존재하는 공변세포 내의 엽록체 수가 배수성과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있고 (Chaudhari and Barrow 1975; Cho et al. 1996; Koornneef et al. 1989; Park et al. 1997), 또한 공변세포 내의 엽록체 수는 간지로 배수성을 판정하는 데 유용한 지표가 될 수 있다. 그러나, 식물 종 간 또는 일부 식물체에서는 식물개체 내의 부위, 연령에 따라서 배수성이 다르며, 재배 환경에 따라서도 차이를 보이고 있다 (Galbraith et al. 1991; Gendreau et al. 1997; Mii et al. 1997; Mishiba and Mii 1997). 담배의 경우 기내의 환경조건 및 연령에 따른 공변세포 내의 엽록체 수와 배수성의 상관에 대한 자세한 연구 결과는 거의 보고되지 않고 있다. 따라서, 공변세포 내의 엽록체 수를 배수성을 판별하는 지표로 활용하기 위해서는 이에 대한 보다 구체적인 검토가 필요하다.

본 연구는 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4) 식물체의 공변세포 내의 엽록체 수가 배수성을 검정하는 간이지표가 될 수 있는지를 검토하기 위하여 정상주와 약배양 유래 반수체, 반수체를 콜히친 처리하여 얻어진 식물체 및 그 식물체의 후대식물체를 사용하여 식물체 간의 배수성과 공변세포 내의 엽록체 수의 상관 관계를 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용한 재료는 Bright Yellow에서 비형엽계로 선발된 황색종 담배인 *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4 ($2n=4x=48$)와 이 재료로부터 약배양하여 획득한 반수성 식물체 ($2n=2x=24$), 반수체 식물에 콜히친을 처리하여 염색체를 배가시킨 식물체 ($2n=4x=48$) 및 배가식물체의 F₁ 식물체 ($2n=4x=48$)를 이용하였다.

반수체 식물의 유도 및 염색체 배가

약배양은 담배식물체로부터 화아의 크기가 11~13 mm 정도의 것을 채취하여 1% sodium hypochlorite에서 15분간 침적한 다음 멸균증류수로 3회 세척하였다. 멸균된 화아로부터 약을 분리하여 kinetin 1 mg/L, IAA 2 mg/L, 30 g/L sucrose가 첨가되고 pH가 6.70으로 조정된 Nakata 배지 (Nakata and Kurihara 1972)에 치상하였다. 배양은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 연속광 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 조건에서 수행하였다.

약배양 과정을 통하여 재분화시킨 반수체 유식물체를 염색체 배가를 위하여 약광하에서 0.02% 농도의 콜히친을 72시간 동안 뿌리에 침적 처리한 다음 멸균수로 2분간 3회 수세하였다. 이 식물체를 3일간 기내조건과 유사한 환경에서 유지시킨 다음 pot에 이식하였다. 이식 후 잎이 편평하지 않아 콜히친 처리효과를 보인 식물체에서 선별적으로 신초를 유도하였다.

Flow cytometry

식물체간 배수성을 동정하고자 기내 배양중인 식물체와 pot에서 재배중인 식물체로부터 0.5 cm^2 크기로 잎을 채취하여 0.25 ml의 HR-A 용액 (Partec 사)을 첨가하고 조직을 chopping하였다. 이 조직액을 $30 \mu\text{m}$ 의 막 (partec CellTrics™)에 통과시킨 후 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 1.0 ml의 HR-B 용액 (Partec 사)을 첨가하여 염색한 다음 flowcytometer (Partec PA-II, Germany)를 사용하여 각 세포 당 DNA 함량을 측정하였다.

공변세포 내 엽록체 수 조사

공변세포의 엽록체 수는 pot 또는 기내 배양 식물체에서 채취한 잎 뒷면의 공변세포를 이용하였다. 잎의 이면을 분리하여 슬라이드 글라스 위에 올려놓고 이면표피 부분만 올려내었다. 표피조직 위에 iodine-potassium iodide 용액 [1% iodine (w/v), 2% (w/v) potassium iodide]을 한 방울 떨어뜨린 다음 cover glass를 덮고 검경하였다. 공변세포 내의 엽록체 수는 3개체의 잎에서 10개의 세포 내의 엽록체 수를 조사한 후 평균하여 산출하였다. 잎은 상위 (2~3엽), 중위 (5~6엽), 하위 (8~9엽)로 나누어 조사하였다.

식물체의 형태적 특성 및 화분발아 조사

식물체의 형태적 특성으로 최대 엽장폭비 (개화 2주 전 식물체)와 화기의 크기를 조사하였다. 화기의 크기는 만개한 꽃의 지방 밑부터 화판 끝까지의 길이, 화관 내부의 최대직경, 그리고 생중량을 조사하였다.

화분발아 조사는 Park 등 (1996)의 방법에 따라 수행하였다. 개화성기의 성숙한 꽃가루를 채취하여 화분 발아용 용액 (10% sucrose, 0.01% boric acid, 3 mM calcium nitrate)에서 25°C , 4시간 동안 정지한 다음 광학현미경 (Olympus SZX12, Japan) 하에서 화분발아가 이루어진 화분을 계수하여 백분율로 표시하였다.

결과 및 고찰

Flow cytometry에 의한 배수성 비교

배수성과 공변세포 내 엽록체 수와 관련성을 검토하기 위해서는 배수성을 명확히 할 필요가 있다. 체세포분열의 간기의 핵 DNA 함량을 측정하면 식물체의 배수성 정도를 판정할 수 있기 때문에 (Galbraith et al. 1983; DE Laet et al. 1987), 정상주를 약배양하여 획득한 반수성 개체와 염색체 배가제로서 콜히친을 처리하여 유도한 개체들의 배수성을 flowcytometer로 측정하여 정상주와 비교하였다. 공시재료의 세포 당 DNA 함량으로써 배수성 패턴을 검토한 결과 (Table 1), G₁ phase의 세포 당 DNA 함량은 반수체가 정상주의 절반의 DNA 량을 보였고, 콜히친 처리에 따른 염색체 배가체와 그 후대식물 (F₁)에서는 정상주와 비슷한 DNA 함량을 나타내었다. 따라서, 콜히친으로 염색체를 배가시킨 계통과 그 후대식물은 정상주 담배식물체와 같은 4배체 (2n=4x=48)이고, 약배양으로 유도한 식물체는 그 반수인 2배체 (2n=2x=24)로 판명되었다. 또한 이러한 배수성 경향은 기내에서 재배시킨 식물체에서도 변함없이 안정하게 나타났다 (자료 미제시). 이와 같이 flow cytometry 분석으로 정상주 담배식물체 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4)는 AB 계놈이며 2n=48이라는 것이 이미 알려진 사실과 일치함을 확인하였다. 또한 반수체는 2n=24이고 콜히친으로 염색체 배가시킨 계통과 그 후대식물에서는 2n=48임을 확인할 수 있었다. 따라서, 공시재료는 배수성관계를 유지하였고 본 실험의 재료에 사용하기에 적합하였다. 한편, 엽령에 따른 배수성을 판별한 결과, 유연인 상위엽의 G₁ phase의 DNA 함량 peak는 94.30, 오래된 잎인 하위엽은 99.68로서 상위엽 (2엽)과 하위엽 (8엽) 간에 배수성 패턴은 차이가 없었다.

이러한 결과로부터 flow cytometry는 다양한 식물 종의 배수성을 판별하는 데 매우 유리하며 실제로 많은 식물 종에서 이용되고 있다 (Galbraith et al. 1983; DE Laet et al. 1987; Miyoshi and Asakura 1996). 예를 들어 난과 식물에서는 동일 개체 내의 잎과 뿌리 간, 뿌리 내에서도 근단 분열부위와 신장대 이후 조직 간에 따라 배수성 변이가 관찰되며 (Mii et al. 1997), 쇠비름과 식물에서는 엽령에 따라서 (Mishiba and

Mii 1997), 애기장대 (Galbraith et al. 1991)에서는 동일 개체 내 부위에 따라서 배수성이 크게 다르다고 하였다. 그러나, 본 연구의 담배에서는 잎의 부위별, 기내의 재배환경 변화에 따른 배수성 변이는 관찰되지 않았다.

배수성에 따른 식물체의 형태적 특성

반수체 식물체는 줄기가 가늘고 식물체가 왜소하며, 꽃의 형태는 정상주보다 작고 가늘었다 (Figure 1A, B). 또한 콜히친 처리에 따라 염색체가 배가된 식물체는 꽃의 크기가 정상주 수준으로 회복되어 반수체보다 크게 나타났다 (Figure 1C, D). 꽃의 길이는 반수체가 45.3±0.5 mm로서 정상주와 염색체가 배가된 식물체의 57.5±0.4 mm, 55.7±0.2 mm보다 작았다. 화경도 반수체에서 작게 관찰되었으며, 또한 꽃의 생중량도 반수체가 정상주에 비해서 46.4% 정도의 중량을 보였고, 콜히친 처리로 염색체가 배가된 식물체는 정상주보다 약간 무겁게 측정되었다 (Table 2). 그 외 배가된 식물체와 그 F₁ 식물체에서 꽃의 길이는 대체로 정상주보다 약간 짧지만 화경은 약간 크게 나타났다 (Figure 1C, D, E, F).

잎의 경우 반수체는 가늘고 작았으며, 염색체가 배가된 이배체는 정상주의 잎과 비슷한 크기를 나타내었다. 최대엽장폭비는 정상주에서 1.98±0.04로 이배체와 그 후대의 2.05±0.04 및 1.94±0.04과 거의 비슷하였다. 반면 반수체는 3.52±

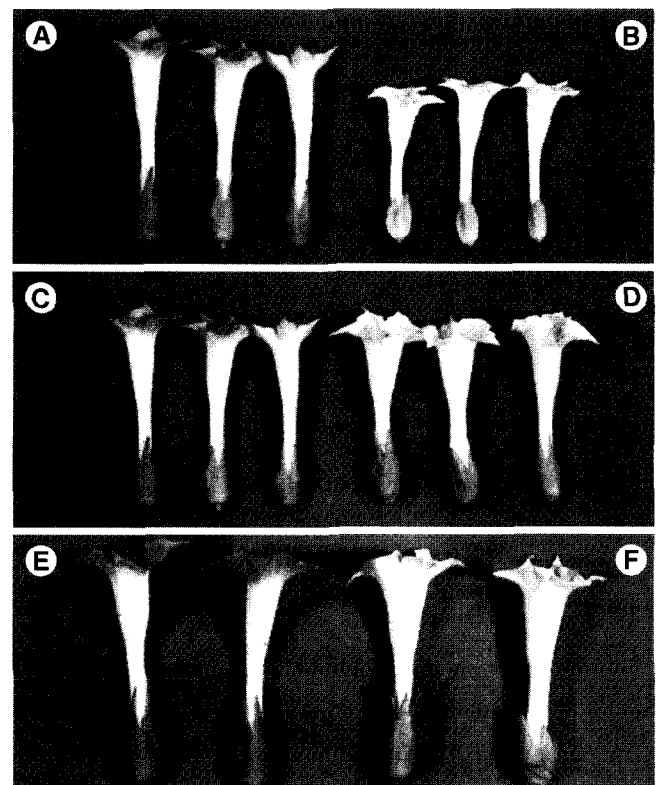


Figure 1. Flowers of haploid (B) and diploid (A, C, D, E, F) of *N. tabacum* L. cv. BY-4. A, C and E, Wild-type (2n=4x=48); B, Anther-derived haploid (2n=2x=24); D, Doubled-haploid (2n=4x=48); F, F₁ of the doubled-haploid (2n=4x=48).

Table 1. DNA contents of leaf cells of tobacco (*N. tabacum* L. cv. BY-4) plants by flow cytometry.

Leaf source	Peak DNA content of leaf cells ^a	
	G ₁ phase	G ₂ phase
Wild-type	94.30	193.43
Anther-derived plant	46.44	156.30
Doubled-haploid plant	93.17	186.69
F ₁ of the doubled plant	99.14	198.06

^aFifth or sixth leaves of the plants were used for flow cytometry.

0.11로서 정상주나 이배체보다 약 1.75배 정도 잎이 가늘었다.

공변세포의 크기를 살펴보면, 반수체는 길이가 11~13 μm , 폭이 13~14 μm 이고, 정상주는 각각 17~21 μm , 14~15.5 μm 이며, 이배체와 그 후대는 각각 17~21 μm , 14~18 μm 로 이배체가 반수체보다 크게 관찰되었다 (Figure 3A~H). 이러한 결과는 다른 식물 중에서 이미 보고된 바 (Bridgen and Veilleux 1988; Cho et al. 1996; Oh et al. 1994; Park et al. 1997)와 마찬가지로 잎의 형태, 꽃과 공변세포의 크기가 배수성 식물체가 갖는 특징을 뚜렷하게 보여주었다.

Table 2. Differences of the flowers sizes of *N. tabacum* L. cv. BY-4 by different ploidy level.

Flower source	Length (mm) ^a	Diameter (mm) ^b	Fresh weight (mg)
Wild-type	57.5±0.4 ^c	8.8±0.6	464.0±15.3
Anther-derived plant	45.3±0.5	7.3±0.4	215.5± 3.1
Doubled-haploid plant	55.7±0.2	9.2±0.2	498.6± 9.1
F ₁ of the doubled plant	56.2±0.2	9.0±0.2	497.1± 6.9

^aLength indicates distance (mm) from bottom of ovary to tip of petals.

^bInner diameter (mm) of tip of corolla of flowers.

^cMean ± standard error.

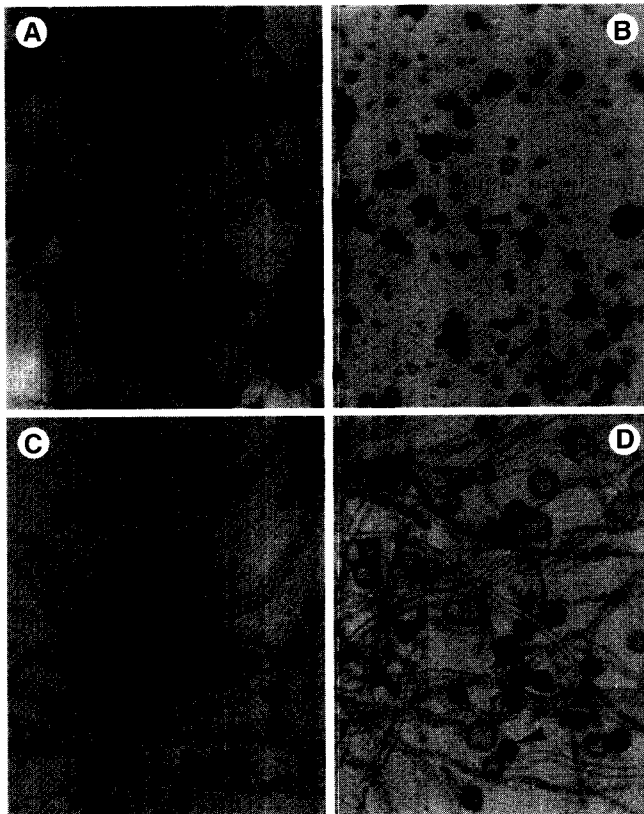


Figure 2. *In vitro* germination of pollens of *N. tabacum* L. cv. BY-4. A, Wild-type ($2n=4x=48$); B, Anther-derived haploid ($2n=2x=24$); C, Doubled-haploid ($2n=4x=48$); D, F₁ of the doubled-haploid ($2n=4x=48$). A, B, C, D (100×). Arrow heads indicate abnormal pollen.

화분 발아력의 차이

배수체의 화분의 입성 특성을 조사하고 화분의 건전도를 평가하기 위하여 화분의 발아율을 검토한 결과 (Figure 2A, B, C, D), 반수체는 화분의 발아가 전혀 관찰되지 않는 반면 콜히친을 처리하여 염색체를 배가시킨 식물체에서는 약 91% 정도 화분의 발아율을 보여주었다. 이것은 정상주의 화분발아율 99%에 비해 약간 낮게 나타났으나 증자의 성숙에는 큰 문제가 없었다. 또한 이배체 후대식물의 화분발아율도 약 92% 정도로 관찰되었다.

공변세포 내 엽록체 수 비교

상기 실험에서 배수성으로 판명된 재료들을 사용하여 재배 환경이 다른 조건에서 자란 공변세포의 엽록체 수를 조사하였다 (Table 3, 4). Pot에서 재배된 식물체의 경우 엽령에 따른 공변세포 내의 엽록체 수는 2~3엽, 5~6엽, 8~9엽기 모든 성장단계에서 정상주의 경우 $22.7\pm0.4\sim23.7\pm0.4$ 개로 관찰된 반면 반수체는 $11.5\pm0.3\sim11.7\pm2.1$ 개를 보여주었다. 이것은 정상주가 반수체에 비해 2배의 엽록체 수를 갖고 있다는 것을 시사한 것이다. 또한 반수체를 염색체 배가시킨 식물체의 잎에서는 $22.6\pm0.4\sim23.0\pm0.4$ 개로 배수성이 증가함에 따라 공변세포 내 엽록체 수도 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 증가는 F₁ 세대에서도 유사하게 나타났다 (Table 3, Figure 3A~H). 기내 배양의 경우도 pot 재배 시와 같이 배수성과 공변세포 내 엽록체 수는 서로 밀접한 상관관계를 나타냈다 (Table 4). 따라서, 본 논문에서 사용된 담배의 경우 재배환경 차이에 따른 공변세포 내 엽록체 수의 변화는 관찰되

Table 3. Chloroplast number per guard cell pairs of leaves of *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4 cultured in pot^a.

Leaf stage ^b	Wild-type	Haploid	Doubled-haploid (DH)	F ₁ of DH
Young	23.7±0.4	11.5±0.3	22.6±0.4	22.7±0.9
Middle	23.2±0.5	11.7±2.1	23.0±0.4	22.9±0.7
Old	22.7±0.4	11.7±0.4	22.6±1.1	22.7±0.9

^aTen guard cell pairs from independent 3 plants were scored for counting.

^bYoung, second or third leaf; Middle, fifth or sixth leaf; Old, eighth or ninth leaf.

Table 4. Chloroplast number per guard cell pairs of leaves of *N. tabacum* L. cv. BY-4 cultured on *in vitro*^a.

Leaf stage	Wild-type	Haploid	Doubled-haploid (DH)	F ₁ of DH
Middle ^b	23.3±0.3	11.6±0.2	23.2±0.4	22.9±0.6

^aTen guard cell pairs from independent 3 plants were scored for counting.

^bMiddle, fifth or sixth leaf.

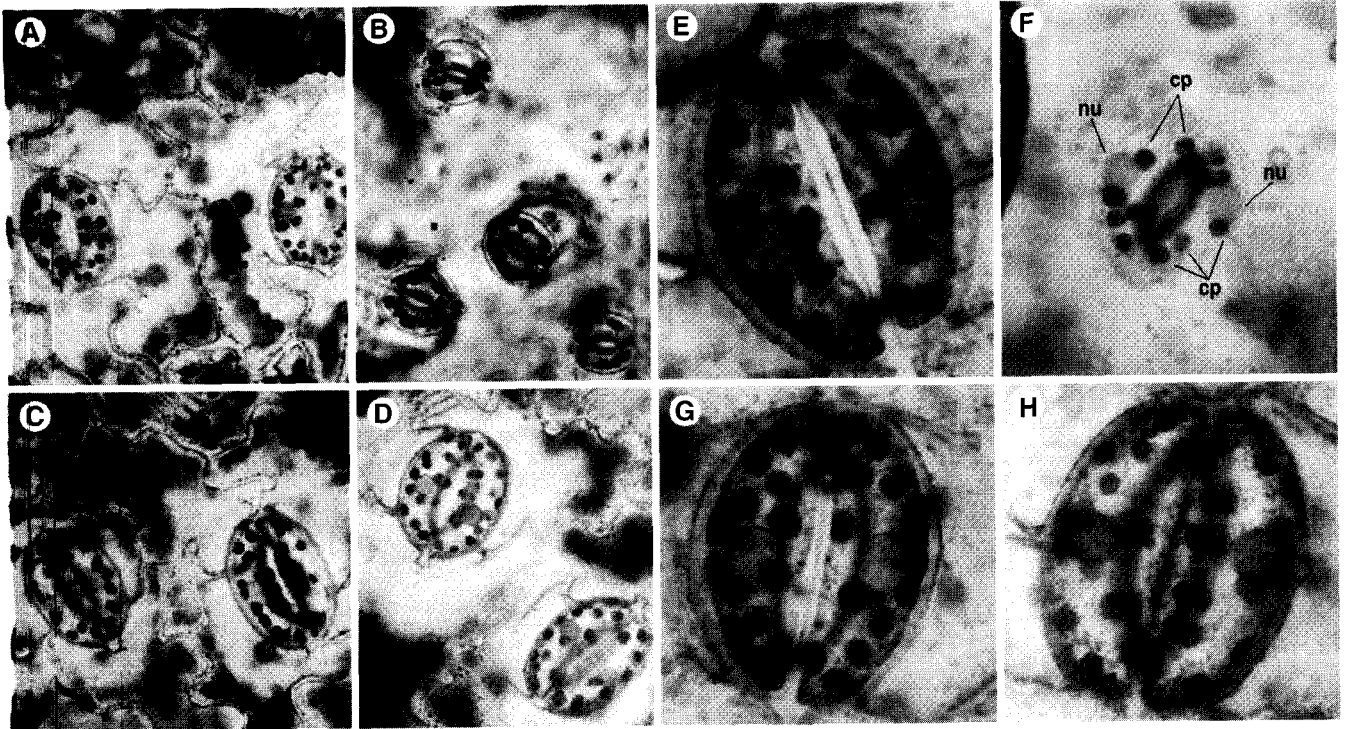


Figure 3. Chloroplasts in guard cell pairs of the fourth leaves of *N. tabacum* L. cv. BY-4 cultured in pot. A and E, Wild-type ($2n=4x=48$); B and F, Anther-derived haploid ($2n=2x=24$); C and G, Doubled-haploid ($2n=4x=48$); D and H, F_1 of the doubled-haploid ($2n=4x=48$). A, B, C and D ($400\times$), E, F, G and H ($1000\times$). cp; chloroplast; nu, nucleus.

지 않았다.

이상의 결과는 BY-4 담배의 반수체와 이수체 간에 있어서 공변세포 내 엽록체의 수는 배수성 변화에 매우 밀접하게 관련되어 있고 엽령과 기내의 재배환경의 차이에 따라서도 변동되지 않으며, 또한 배수성 증가에 따른 공변세포 내의 엽록체 수가 후대에서도 안정하게 유지됨을 확인하였다. 따라서 BY-4 담배의 경우 타식물체에서 보고 (Galbraith et al. 1991; Mii et al. 1997; Mishiba and Mii 1997)된 배수성이 불안정한 것과는 다르게 공변세포 내 엽록체 수의 변동이 매우 안정한 요소라는 것을 반증해 준다. 그러므로, 공변세포 내 엽록체 수는 BY-4 담배에 있어 배수성을 측정하는 데 신뢰할 만한 요소로 평가되었으며, 기내배양중인 식물이라도 일단 확보하면 손쉽게 엽색체의 배가여부를 확인할 수 있다. 이러한 방법을 이용하면 polysomaty의 문제가 없는 한 다른 식물종에 대해서도 이의 적용이 가능할 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합하면 BY-4 담배에서 2배체와 4배체의 배수성 판별은 공변세포 내의 엽록체 수를 조사하는 것으로 간단히 가능하다. 또한 이 방법은 매우 간단한 방법이기 때문에 간이로 배수성만을 검토하고자 할 때, 고가 장비의 설치와 분석비용이 필요한 flow cytometry 방법보다 손쉽게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

담배 정상주 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4), 약배양으로 유도시킨 반수체 ($2n=2x=24$), 콜히친 처리로 엽색체를 배가한 식물체 ($2n=4x=48$) 및 그 후대식물체 (F_1)를 각각 사용하여 배수성에 따른 공변세포 내 엽록체 수를 조사하였다. 공변세포 내 엽록체의 수는 정상주에서 반수체의 2배로 배수성과 밀접한 관계를 나타내었다. 또한, 반수체를 콜히친으로 배가시킨 식물체에서 공변세포 내 엽록체의 수는 반수체의 2배로 배수성이 회복됨에 따라 증가하였다. 이배체의 후대식물에서도 공변세포 내 엽록체 수의 변동도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 기공의 공변세포 내에 분포하는 엽록체 수와 배수성 ($2x$ 와 $4x$)과는 밀접한 관계가 있음을 시사하는 것이다. 기내에서 성장한 식물체에서 공변세포 내 엽록체의 수는 pot 재배식물체와 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 잎의 공변세포 내 기공수는 배수성을 간단하게 판정하는데 이용될 수 있을 것으로 보인다.

사사 - 본 논문은 한국과학기술재단 (KOSEF)에서 지원하는 전남대 농업식물 스트레스 연구센터 (APSRC)의 연구비 지원에 의해 수행된 것임.

인용문헌

- Bridgen MP, Veilleux RE** (1988) A comparison of *in vitro* flowers to *in vivo* flowers of haploid and diploid *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* **13**:3-13
- Chaudhari HK, Barrow JR** (1975) Identification of cotton haploids by stomatal chloroplast-count technique. *Crop Sci* **15**:760-763
- Cho HM, Choi YW, Om YH, Kim JK** (1996) Chromosome doubling of *Solanum tuberosum* dihaploid-*S. chacoense* hybrids through *in vitro* adventitious bud formation in potatoes. *Kor J Breed* **28**:123-127
- DE Laat AMM, Göhde W, Vogelzang JDC** (1987) Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breed* **99**:303-307
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E** (1983) A rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**:1049-1051
- Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S** (1991) Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **96**:985-989
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Höfte H** (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **114**:295-305
- Koornneef M, van Diepen JAM, Hanhart CJ, Kieboom-de Waart AC, Martinelli L** (1989) Chromosomal instability in cell- and tissue cultures of tomato haploids and diploids. *Euphytica* **43**:179-186
- Lee SC, Kum WS, Lee JD** (1982) Agronomic characters of dihaploids derived from *in vitro* anther culture of *Nicotiana tabacum* L. *Kor J Breed* **14**:115-120
- Mii M, Mishiba K, Tokuhara K** (1997) Polysomaty and ploidy determination in *Phalaenopsis*. *Breed Sci* **47**(S-2):373
- Mishiba K, Mii M** (1997) Tetraploid production and flow cytometric analysis of polysomaty in *Portulaca grandiflora* Hook. *Breed Sci* **47**(S-2):374
- Miyoshi K, Asakura N** (1996) Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*). *Plant Cell Rep* **16**:1-5
- Nakata K, Kurihara M** (1972) Competition among pollen grains for haploid tobacco plant formation by anther culture. II. Analysis with resistance tobacco mosaic virus (TMV) and wildfire diseases, leaf color, and leaf base shape characters. *Jpn J Breed* **22**:92-98
- Oh SC, Soh WY, Cho DY, Yang DC** (1994) Enzyme activity in plant regeneration from diploid and haploid calli of *Nicotiana tabacum* cv BY4. *Kor J Plant Tiss Cult* **21**:333-339
- Park HJ, Min KS, Kim CW** (1997) Characteristics of interspecific and double hybrid between *Gossypium hirsutum* and *G. arboreum*. *Kor J Breed* **29**:244-248
- Park SK, Yoon YH, Kim BC, Hwang YH, Chung IK, Nam HG, Kim DU** (1996) Pollen of a male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana* isolated from a T-DNA insertion pool is not effectively released from the anther locule. *Plant Cell Physiol* **37**:580-585
- Pinheiro AA, Pozzobon MT, do Valle CB, Penteado MIO, Carneiro VTC** (2000) Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Rep* **19**:274-278
- Sari N, Abak K, Pitrat M** (1999) Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. *Sci Hort* **82**:265-277

(접수일자 2001년 7월 24일)