

고추의 소포자 배양 시 모식물의 생육조건, 소포자 나출 방법, 치상배지 및 광배양이 배의 발생에 미치는 영향

이종숙, 박은준, 김문자*
목원대학교 생명과학과

Influence of donor plant growth condition, microspore isolation method, culture medium, and light culture on the production of embryos in microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.)

Jong-Suk Lee, Eun-Joon Park, and Moonza Kim*

Department of Life Sciences, Mokwon University, 800 Doan-dong Seo-gu, Taejeon 302-729, Korea

ABSTRACT To establish an efficient and reliable microspore culture system for pepper (*Capsicum annuum* L.), the effect of light intensity used for donor plant's growth, microspore isolation methods, the composition of culture medium, and culture period in light on the production of embryos were investigated. The viability of microspores taken from the plants grown under the light intensity of 10,000 lux was almost same as that from the lower (5,500 lux) light intensity, and the embryo induction and development were a bit higher when donor plants were grown under the lower light intensity. This result implies that lower light intensity does not interfere with the embryo induction and development. However, it was very difficult to prepare microspores for culture since only a small number of flower buds could be harvested from plants grown under the light intensity of 5,500 lux. Microspore isolation methods greatly affected microspores viability; that is, when microspores were isolated by blending rather than maceration, the greater number of viable microspores were easily generated (about 13 times). Among media used for microspores culture in this study, MN medium was most efficient for embryo induction and development. Total number of embryos and the number of cotyledonary embryos were highest when microspores were cultured in dark for 4 weeks, and then in light for one week. These results will be provide valuable information to set up efficient microspore culture system of hot pepper with a high frequency of embryo production, which are applicable to gene transformation and mutagenesis.

서 론

반수체는 콜히친과 같은 방추사생성억제제를 처리하여 단

세대에 100% 동형접합자인 배가 반수체 (doubled haploid)를 용이하게 만들 수 있으므로 식물 육종에 매우 유용하게 이용될 수 있다. 반수체를 인위적으로 생산하는 방법으로 가장 널리 이용되고 있는 것은 약배양과 소포자배양이다. 약배양은 적기의 소포자가 들어있는 약을 배양하는 것으로 독

*Corresponding author Tel 042-829-7581 Fax 042-829-7580

E-mail: kim70@mokwon.ac.kr

말풀 (Guha and Maheshwary 1964)에서 처음 성공한 이래 유채, 밀, 보리 등 많은 식물에서 소포자 유래의 반수체 생산에 성공하였다 (Datta 2001). 소포자배양은 적기의 꽃봉오리로부터 소포자만을 나출 시켜 배양하는 것으로 꽃양배추 (Kameya and Hinata 1970)에서 처음 성공하여 캘러스를 유기한 이후 유채 (Baillie et al. 1992), 밀 (Hu and Kasha 1997), 보리 (Datta 2001), 옥수수 (Pescitelli et al. 1990), 사과 (Höfer et al. 1999) 등 많은 식물에서 성공하였다.

소포자배양은 나출한 소포자만을 배양하므로 약벽 조직과 같은 체세포 조직에서 캘러스나 배가 형성될 염려가 없으며, 농도구배원심분리에 의해 적기의 소포자만을 수확하여 배양 할 수 있다 (Kyo and Harada 1990). 또 소포자배양 시에는 대부분의 경우 캘러스시기를 거치지 않고 바로 배로 발달하므로 단기간에 반수체를 획득할 수 있으며 약배양에 비해 배와 유식물체의 발생이 매우 높다. 유채의 경우 배의 발생이 약배양에 비해 10배나 높으며 (Siebel and Pauls 1989), 보리에서는 'Igrī' 품종을 사용하는 경우 녹색유식물체의 발생이 100~200배 높다 (Davies and Morton 1998). 이 뿐만 아니라 배양 소포자는 반수성인 동시에 단세포 상태이기 때문에 동형접합자인 배가반수체의 획득뿐만 아니라 형질전환, 돌연변이 유기 및 배발생 기작 규명 등에 매우 유리하다.

이와 같은 장점에도 불구하고 소포자만 분리하여 배양할 경우 배나 캘러스의 발생이 용이하지 않으므로 소포자배양에 성공한 식물이 많지 않다. 현재까지 소포자배양이 비교적 용이하게 이루어져서 다량의 배를 획득할 수 있는 식물은 유채 (Baillie et al. 1992)를 포함하여 밀 (Datt 2001), 보리 (Datta 2001), 벼 (Raina and Irfan 1998) 등 소수의 식물에 국한되어 있으며 대부분의 식물에서는 소포자배양에 성공하지 못하였거나 성공한 식물에서도 배의 발생 비율이 낮아 형질전환이나 돌연변이 유기 등에 이용되지 못하고 있다.

고추에서는 Testillano 등 (1995)과 Regner 등 (1996)에 의해 소포자배양이 시도 되었으나 소수의 다세포체만 발생하였다. 최근 본 연구자들은 (Kim et al. 2007, Park et al. 2005) 소포자배양에 의해 다수의 배와 유식물체를 획득하는데 성공하였으나 이를 돌연변이 유기, 형질전환, 육종 등에 이용할 수 있으려면 소포자 배양 효율을 높여 더 많은 배를 획득할 수 있어야 한다.

소포자 배의 발생은 모식물의 생육 조건, 소포자의 발달 시기 및 활력, 전처리 조건, 배지의 조성, 배양 온도, 광조건

등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받는다 (Buyukalaca et al. 2004, Swanson 1990). 이 중 모식물의 생육은 야외포장, 온실 또는 생장실이나 생장기 (growth chamber)에서 이루어 지는데 생육환경에 따라 소포자 배의 발생이 크게 달라진다. 밀의 경우 모식물의 생육이 생장기에서 이루어진 경우에만 소포자들이 분열하며 야외포장이나 비료가 부족한 상태에서 생육된 경우에는 분열하지 못하고 모두 죽는다 (Cistué et al. 2006). 토마토의 경우 포장에서 생육된 모식물에 비해 온실에서 생육된 모식물에서 캘러스와 배의 발생이 높고, 옥수수에서는 온실에서 생육된 모식물에 비해 생장기에서 생육된 모식물에서 ELS (embryo-like structures)의 발생이 높다 (Afele et al. 1992, Shtereva et al. 1998). 이와 같이 모식물의 생육은 야외 포장보다는 온도, 광주기, 광도 등이 조절되는 온실이나 생장실에서 이루어지는 것이 효과적인데 소포자 배의 발생뿐만 아니라 배양 시 반복성 있는 결과를 얻기 위해서도 생육조건이 일정하게 유지되는 곳에서 이루어지는 것이 바람직하다. 소포자 배의 발생은 온실이나 생장실의 온도와 광주기에 따라 크게 달라지며 광도 또한 배의 발생에 영향을 미치는데 *Brassica* 종이나 담배의 경우 저광도 보다는 고풋광에서 다세포체나 배의 발생이 높다 (Dunwell 1976, Keller et al. 1983, Thurling and Chay 1984).

소포자를 배양하기 위해서는 꽃봉오리나 약으로부터 비교적 용이하게 소포자를 나출하여 수확할 수 있어야 하는데 나출 방법은 옥수수, 보리, 유채에서처럼 blending하거나 (Kasha et al. 2001, Pescitelli et al. 1990, Swanson 1990), 말뚝이나물에서처럼 막자사발을 사용하여 maceration하거나 (Kernan and Ferrie 2006), 밀에서처럼 magnetic bar를 이용하여 진탕하거나 (Shariatpanahi et al. 2006) vortexer를 이용하는 (Hu et al. 1995) 등 식물에 따라 다양하다. 소포자의 나출 방법에 따라 활력 있는 소포자와 분열소포자의 비율이 달라지는데 사과의 경우 magnetic bar-stirring 방법에서는 활력 있는 소포자의 비율이 60~80%이나 체를 이용한 maceration 시에는 27%로 매우 낮다 (Höfer et al. 1999). 또 밀의 경우 vortexing, sonication, stirring 그리고 maceration 방법들을 비교하면 vortexing 시에 활력 있는 소포자와 분열소포자의 비율이 높으며 (Hu et al. 1995), 큰조아재비에서는 maceration에 의한 방법에 비해 blending 하는 경우에 활력 있는 소포자와 다핵체의 발생이 높다 (Guo and Pulli 2000). 이와 같이 식물에 따라 다양한 방법들이 이용되고 있으나 현재 밀, 유채 등을

비슷한 많은 식물들의 경우 비교적 용이하게 활력 있는 소포자를 다량 수확할 수 있으므로 blender를 이용하는 방법이 널리 이용되고 있다 (Kasha et al. 2001, Swanson 1990).

소포자 배의 발생은 배지 내 질소원, 아미노산, 탄소원 등에 의해 크게 영향을 받는데 밀의 소포자배양 시 MMS1 배지에서 KNO_3 를 1,900 mg/l에서 1,400 mg/l로 감소하고, NH_4NO_3 을 1,650 mg/l에서 300 mg/l으로 감소시킨 MMS2 배지를 사용하면 분열 소포자의 수가 많아진다 (Hu and Kasha 1997). 또 밀의 약배양 시 MN6 배지에 serine, proline, glutamine 등의 아미노산을 첨가하면 첨가하지 않은 배지에서보다 배의 발생 및 발달이 증가 한다 (Chu and Hill 1988). 탄소원으로는 sucrose와 maltose가 가장 널리 사용되고 있는데 이중 소포자 배 발생에 효과적인 것은 식물에 따라 달라 밀, 보리 등의 곡류에서는 maltose가, 유채나 말뱅이나물에서는 sucrose가 효과적이다 (Hansen and Suinnset 1993, Kuhlmann and Foroughi-Wehr 1989, Touraev et al. 1996). 기본배지의 조성도 크게 영향을 미치는데 유채에서는 NLN 배지가 (Baillie et al. 1992), 밀에서는 MMS3 배지가 (Hu and Kasha 1997), 보리에서는 FW1B 배지가 (Li and Devaux 2001) 널리 사용되고 있다. 한편 배의 발생 비율을 높이기 위해 여러 가지 배지의 조성을 조합하여 사용하기도 하는데 사과에서는 N6의 무기물 다량원소, MS의 무기물 미량원소 및 B5의 비타민을 조합한 배지를 사용하고 (Höfer et al. 1999), 밀에서는 N6의 1/2 무기물 다량원소와 B5의 1/2 무기물 미량원소 및 비타민을 조합한 배지인 A2 배지를 사용하기도 한다 (Touraev et al. 1996).

소포자배양은 유채에서처럼 배양 초부터 희미한 광 조건에서 배양하거나, 배양 2주 후부터 광조건에 옮겨 배양하기도 하지만 (Gland et al. 1988, Ilić-Grubor et al. 1998) 대부분의 경우 암상태에서 이루어지고 있다. 그러나 동백과 같은 식물에서는 배양 광조건이 매우 커서 암조건에서 배양하는 경우에는 1~2회의 분열만 일어나며 16-h 광주기에서 배양할 경우에서만 proembryo가 형성된다 (Pedroso and Pais 1994).

본 연구에서는 고추의 소포자배양 시 배의 발생 및 발달에 적합한 배양조건을 밝히기 위해 꽃봉오리로부터 소포자의 나출 시 나출 방법이 소포자의 활력에 미치는 영향을 조사하는 동시에 모식물의 생육 광조건, 치상배지의 조성, 및 배양 광조건이 배의 발생 및 발달에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서는 고추 (*Capsicum annuum* L.)의 밀양재래 품종을 사용하였다. 전년도에 채종한 종자를 직경 20 cm 화분에 파종하여 본엽이 2~3매 출현했을 때 생육정도가 비슷한 유묘들을 선발하여 직경 25 cm 화분에 이식하였으며 매주 파종하여 연중 재료 채취가 가능하도록 하였다. 유묘 이식 시 흙은 시판되고 있는 원예용 상토 (부농원에 상토)를 사용하였고 화분 전용 복합비료로 시판되고 있는 파워스톤 (질소 10%, 인산 5%, 수용성 가리 10%)을 1개의 화분에 8 g씩 섞어 준비하였다. 식물은 광주기가 16/8h (명/암), 온도가 25/20°C (명/암)인 성장실에서 생육시켰다. 성장실의 광도는 형광등과 메탈램프를 이용하여 10,000 lux가 되도록 하였고, 상대습도는 60%로 유지 하였다. 식물 성장을 위해 관수는 1~2일마다 실시하였으며 수세가 약화되는 것을 막기 위해 관수 시 마다 적기가 지난 꽃봉오리를 제거하였다. 재료 식물은 정식 8주 후부터 12주까지 사용하였다. 꽃봉오리는 꽃받침과 꽃잎의 길이가 거의 같은 것을 취 한 후 꽃봉오리 내 약의 2/4~3/4이 보라색으로 착색되어 있는 것을 확인 한 후 사용하였다. 이때의 약은 배의 발생에 적기로 알려진 후기 1형성 소포자나 초기 2형성 화분이 내포되어 있었다 (Kim et al. 2004).

모식물의 생육 광조건이 배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 본교에 이미 시설되어 있는 화분 위에서의 광도가 10,000 lux와 5,500 lux로 각기 다른 2곳의 성장실을 이용하였다.

소포자의 나출 및 수확

꽃봉오리들을 2% sodium hypochlorite 용액에 10분간 소독한 후 멸균 증류수로 4회 수세하였다. 멸균된 꽃봉오리 약 30개를 blender cup에 넣고 전처리 배지 (소포자 전처리 참고) 10 ml을 첨가한 후 10초씩 2회 blending (16,000~18,000 rpm)하여 소포자를 나출시킨 후 50 ml centrifuge tube에 모았다. 약 내의 남아 있는 소포자를 꺼내기 위해 10 ml의 전처리 배지를 첨가하여 고속 (5,000 rpm 전후)에서 15초씩 2회 vortexing 하였다. 구멍의 크기가 75 μm 와 38 μm 인 체를 사용하여 크기가 큰 체세포 조직 파편들을 제거한 후 소포자 현탁액을 50 ml centrifuge tube에 모아 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 소포자를 모았다. 상등액을 제거한 후 소

포자 pellet에 전처리 배지 30 ml을 첨가하여 vortexing한 후 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였으며, 이와 같은 수세 과정을 3회 실시하였다.

나출 방법이 소포자 활력에 미치는 영향을 조사하기 위해 체를 이용하여 maceration하는 방법, 막자사발을 이용하여 maceration하는 방법 그리고 blender를 이용하는 방법의 3가지를 사용하였다. 체를 이용한 maceration 방법에서는 50 ml 비커 위에 놓여진 체에 꽃봉오리 20개를 놓고 절굿공이로 같은 후 증류수 5 ml을 사용하여 비커에 모았으며, maceration 방법에서는 막자사발에 꽃봉오리 20개를 넣은 후 증류수 5 ml을 첨가하여 절굿공이로 갈았다. Blender를 이용하는 방법에서는 blender cup에 꽃봉오리 20개를 넣은 후 증류수 5 ml을 첨가하여 blending 하였다. 약내에 남아있는 소포자를 꺼내는 방법, 체세포 파편을 제거하는 방법 및 소포자 pellet를 모으는 방법 등은 위에서 설명한 바와 동일하였다. 모든 실험 기구와 증류수는 냉장 보관하였던 것을 사용하였다.

소포자 전처리

전처리 배지에 소포자 밀도가 $19\sim 21 \times 10^4/\text{ml}$ 이 되도록 hemocytometer를 사용해 조정된 후 90×20 mm 배양접시에 7~10 ml 씩 치상하여 parafilm으로 봉하였다. 소포자 현탁액이 들어있는 배양접시는 건조되는 것을 막기 위해 멸균수로 적신 filter paper가 들어있는 140×20 mm 배양접시에 넣은 후 다시 parafilm으로 봉하였다. 이와 같이 준비된 소포자는 $31 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3일간 고온 처리 하였다.

전처리 배지는 모식물 생육시의 광조건과 소포자 배양시의 광조건이 배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 0.37 M mannitol에 sucrose가 제외된 NLNS 기본배지 (Kim et al. 2007)를 첨가하여 사용하였으며, 배지의 조성이 배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 0.37 M mannitol에 sucrose가 제외된 FW1B 기본배지 (Li and Devaux 2001)를 첨가하여 사용하였다.

소포자의 활력조사

소포자의 활력은 Heslop-harrison (1970)의 방법에 따라 fluorescein diacetate (FDA)를 사용하여 조사하였다. 즉 FDA 2 mg을 1 ml의 acetone에 녹여 stock solution을 만들어 보관한 후 사용 직전에 stock solution 3 μl 를 1 ml의 증류수에 희석

한 working solution을 만들었다. 원심분리하여 모은 소포자를 FDA working solution에 현탁 시켜 10분 후부터 B 또는 IB Filter를 사용하여 형광현미경 하에서 관찰하였으며 이때 진한 녹색의 형광을 나타내는 것만을 활력 있는 소포자로 계수하였다. 활력 있는 소포자의 비율은 slide 상에서 무작위로 3곳 이상의 장소에서 200~300개의 소포자를 계수 한 후 백분율로 환산하였다.

소포자 배양

전처리가 끝난 배양접시 내의 소포자 현탁액을 50 ml centrifuge tube로 옮기고 전처리 배지를 첨가하여 30 ml로 맞춘 다음 1,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 소포자를 모았다. 상등액을 버린 후 배양배지를 첨가하여 소포자 밀도가 대략 $10 \times 10^4/\text{ml}$ 이 되도록 조정된 다음 60×15 mm 배양접시에 1.5 ml 씩 치상하고 1일 후 동량의 배지를 첨가 하였다. 소포자가 들어 있는 배양접시들은 투명한 plastic box에 넣어 25°C 의 암 상태에서 배양하였다.

배양 배지는 NLNS 배지 (Kim et al. 2007)를 사용하였으며, 배지의 조성이 배 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 액체배지를, 이외의 실험에서는 double layer 배지를 사용하였다. Double layer 배지에서 상층의 액체배지는 sucrose가 10% 첨가된 NLNS을 사용하였고 하층의 고체배지는 sucrose 2%와 phytagel 0.4%가 첨가된 1/2 NLNS을 사용하였다. 모든 액체배지는 pore size가 0.45와 0.22 μm 인 membrane을 사용하여 여과 멸균하였으며 pH는 5.8~6.0이 되도록 조정하였다.

배지의 조성이 배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 무기물은 FW1B (Li and Devaux 2001)와 MMS3 (Hu and Kasha 1997) 배지의 것 2가지를, 유기물은 FW1B, NLNS, 및 MMS3 배지의 것 3가지를 조합한 (무기물+유기물) 6가지의 액체배지 즉 FF (FW1B+FW1B), FN (FW1B+NLNS), FM (FW1B+MMS3), MF (MMS3+FW1B), MN (MMS3+NLNS) 및 MM (MMS3+MMS3) 배지를 사용하였다. FW1B 배지는 Kuhlmann와 Foroughi-Wehr B (1989)가 medium C라고 하여 사용한 배지를 Davies와 Morton (1998)이 다소 수정하여 KFWC 배지라고 하여 사용하였으며, 이후 Li와 Devaux (2001)가 다시 수정하여 FW1B라고 하여 보리의 소포자배양 시 사용한 것이다. MMS3 배지는 밀의 소포자배양 시 많이 사용된 배지로 MS 배지 (Murashige and skoog 1962)를 수정한 것이다 (Hu and Kasha 1997).

소포자배양 시 광조건이 배의 발생 및 발달에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 5주 간 암배양 하거나, 암

상태에서 각각 2, 3 및 4주 배양한 후 광 조건인 생장기에 옮겨 각각 3, 2 또는 1주 더 배양 하였다. 이때 생장기의 광주기는 16/8h (명/암), 온도는 25/20℃ (명/암), 광도는 4,500 lux이었다.

결과조사

실험은 각 처리 당 4~11 반복씩 3회 이상 실시하였다. 결과 조사는 모식물의 생육광도와 배양배지가 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 배양 4주 후에, 배양광조건의 영향을 조사한 실험에서는 5주 후에 실시하였다. 해부 현미경 10배의 배율 하에서 배양접시 당 발생한 배를 계수하여 평균과 표준오차를 구하였다.

결과 및 고찰

모식물의 생육 광도가 배의 발생에 미치는 영향

모식물의 생육 광조건이 소포자 배의 발생 및 발달에 미치는 영향을 조사하기위해 본교에 이미 시설되어있는 광도가 10,000 lux와 5,500 lux인 생장실에서 생육된 식물들로부터 꽃봉오리를 취하여 소포자를 나출 시킨 후 전처리 전·후의 소포자 활력을 조사하는 동시에 이들을 NLNS 배지에 배양하여 배의 발생과 발달을 조사하였다. 전처리 전 활력 있는 소포자의 비율은 모식물이 10,000 lux에서 생육된 경우 55.5%였고 5,500 lux에서 생육된 경우 54.8%로 광도에 따른 차이가 거의 없었으며, 전처리 후 활력 있는 소포자의 비율은 10,000 lux에서 생육된 경우 22.2%였으며 5,500 lux에서 생육된 경우 26.9%로 다소 높았다 (성적 미제시). 따라서 모식물의 생육 광 조건이 소포자 활력에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 나타났다.

배양 4주 후 1개의 배양접시에서 발생한 배의 전체 수는 모식물이 10,000 lux에서 생육된 경우 28.3개인데 비해 5,500 lux에서 생육된 경우에는 32.2개로 다소 높았으며, 발생한 자엽

배의 수도 10,000 lux에서 생육된 경우 10.1개 인데 비해 5,500 lux에서 생육된 경우 12.2개로 더 높았다 (Table 1, Figure 1). 따라서 본 실험 시의 광 조건에서는 소포자 배의 발생이나 발달에 미치는 광도의 영향이 크지 않은 것으로 나타났다.

10,000 lux에서 생육된 식물은 정식 12주 후 부터 잎이 갈변하고 줄기가 보라색을 띄며 노화되기 시작하였으나 5,500 lux에서 생육된 식물은 잎이나 줄기의 색이 녹색을 유지하였다. 그러나 5,500 lux에서 생육된 식물은 높이가 낮았으며 한 개체에서 취할 수 있는 꽃봉오리의 수가 매우 적었다. 또 동일한 수의 꽃봉오리로부터 소포자를 나출 하여 수확하는 경우 수확되는 소포자의 양이 적었다 (성적 미제시). 따라서 5,500 lux에서 생육된 식물에서는 배양에 필요한 소포자를 얻기가 매우 어려웠다.

모식물의 생육 광도가 소포자 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 연구는 온도나 광주기 등의 영향을 밝힌 연구에 비해 많지 않으나 일반적으로 고풍도에서 배의 발생이 높은 것으로 알려져 있다. 담배의 약배양시 배의 발생은 모식물의 생육 광도가 7,000 lux 일 때에 비해 14,000 lux 일 때에 높으며 (Dunwell 1976), 유채에서도 8,000 lux 일 때에 비해 32,000 lux 일 때 높다 (Keller et al. 1983). 또 유채의 약배양시 광도를 측정하지 않았으나 차광된 phytotron에서 생육된

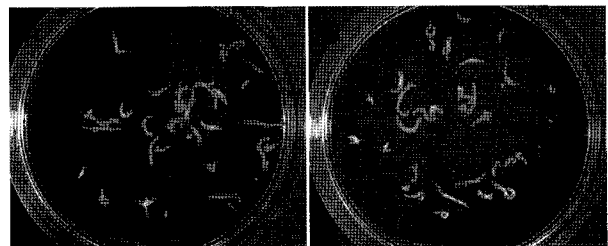


Figure 1. Embryos developed from microspores isolated from flower buds of which mother plants were grown at different light condition. (A) higher light intensity (10,000 lux), (B) lower light intensity (5,500 lux). Embryos were observed after 4 weeks of culture. The scale bar (10 mm) in (a) applies to (b) as well.

Table 1. Influence of the light intensity during the growth of donor plant on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper

Light intensity (lux)	No. of embryos/plate			
	globular & heart	cotyledonary & torpedo	ELS ^a	Total
10,000	5.7±4.4	10.1±3.7	13.8±3.8	28.3±10.7
5,500	5.9±3.9	12.2±4.4	16.2±5.6	32.2±8.7

^aELS indicates embryo-like structure. Values are the means of three independent experiments with 11 replicates for each treatment. Every plate contains approximately 150,000 microspores.

모식물에서 보다 차광되지 않은 phytotron에서 생육된 모식물에서 다세포체의 발생이 높다 (Thurling and Chay 1984). 본 연구 결과 담배 (Dunwell 1976)나 유채 (Keller et al. 1983)에서와는 달리 저광도에서 생육된 모식물에서 배의 발생과 발달이 높았는데 이는 본 실험 시 모식물의 생육광도가 10,000 lux와 5,500 lux로 매우 낮았으며 온도, 광주기 등의 생육조건이 달랐기 때문인 것으로 생각된다. 실제 유채의 약배양 시 모식물의 생육 광도가 각각 32,000, 16,000 및 8,000 lux 인 경우 배의 발생은 32,000 lux와 8,000 lux를 비교하면 고광도인 32,000 lux에서 생육된 경우에 높으나 16,000 lux와 8,000 lux를 비교하면 저광도인 8,000 lux에서 생육된 경우에 더 높다 (Keller et al. 1983). 또 담배의 약배양 시 모식물의 생육 광도가 소포자배 발생에 미치는 영향은 광주기에 따라 달라져서 8-h 광주기에서는 배의 발생이 7,000 lux에 비해 14,000 lux에서 많으나, 16-h 광주기에서는 오히려 7,000 lux에서 많다 (Dunwell 1976).

소포자 배의 발생뿐만 아니라 식물 생장의 속도, 개화기에 도달하는 시간, 꽃봉오리의 형성 등도 광주기, 광도 등과 같은 생육환경에 의해 영향을 받는다 (Baillie et al. 1992, Kasperbauer 1970). 담배의 약배양 시 모식물이 8-h 광주기이며 14,000 lux로 고광도인 조건에서 생육된 경우 배의 발생이 많은데 이와 같은 조건에서는 꽃봉오리의 형성 시기도 빠르다 (Dunwell 1976). 한편 유채의 소포자배양 시 모식물을 추대 전에 25/15°C 인 온실에서 10/15°C 인 생장기로 옮기면 배의 발생은 많아지지만 저온으로 인해 식물의 생장속도는 늦어진다. 본 연구 결과 모식물이 저 광도인 5,500 lux에서 생육된 경우 고광도에 비해 배의 발생은 다소 높았으나 한 개체에서 취할 수 있는 꽃봉오리의 수가 매우 적었으며 동일한 수의 꽃봉오리에서 수확할 수 있는 소포자의 양도 적어 배양에 필요한 소포자를 준비하기가 매우 어려웠다. 따라서 소포자 배양을 위해서는 배의 발생뿐만 아니라 다수의 꽃봉오리를 수확하는데 적합한 생육조건을 밝힐 수 있어야 할 것이다.

소포자 배의 발생은 온도, 광주기, 광도와 같은 모식물의 생육조건에 의해 크게 영향을 받는데 야외포장 보다는 온도,

광주기 등이 조절되는 온실이나 생장실에서 생육 시 효과적이다 (Shtreva et al. 1998, Afele et al. 1992). 또 약 이나 소포자배양 시 반복성 있는 결과를 얻기 위해서도 모식물은 생육조건이 일정하게 유지되는 생장실에서 생육되는 것이 바람직하다. 그러나 생장실의 시설 시 광도를 높이기 위해서는 많은 비용이 들게 되므로 광도가 소포자배의 발생에 미치는 영향을 명확하게 밝힐 수 있어야 하는데 고추의 경우 약배양 시 포장에서 자란 모식물 보다 온실에서 자란 모식물을 사용하는 경우 배의 발생이 4배 이상 높다는 보고가 (Buyukalaca et al. 2004) 있을 뿐 광도의 영향을 밝힌 연구가 없다. 본 연구 결과 소포자배양 시 배의 발생이나 발달은 모식물이 10,000 lux에 비해 저광도인 5,500 lux에서 생육된 경우에 다소 높았으나 꽃봉오리의 수가 매우 적어 배양에 필요한 소포자를 수확하기가 매우 어려웠다. 따라서 많은 비용을 들여 광도만 높이기보다는 광주기, 온도, 비료, 관수 등을 조절하여 다수의 꽃봉오리를 수확할 수 있는 생육조건을 밝히는 것이 더 중요한 것으로 생각된다.

소포자의 니출 방법이 소포자 활력에 미치는 영향

꽃봉오리로부터 소포자의 니출시 니출 방법이 소포자 활력에 미치는 영향을 조사하기 위해 blending, 막자사발을 이용한 maceration 및 체를 이용한 maceration의 3가지 방법을 이용하여 소포자를 니출 시킨 후 활력 있는 소포자의 비율을 조사한 결과 막자사발과 체를 이용한 maceration 시에는 각각 3.7%와 3.0%이었으나 blender를 사용하였을 때는 49.5%로 13배 이상 높았다 (Table 2, Figure 2). 또 동일한 수

Table 2. The effect of different isolation methods on the viability of microspores harvested from pepper flower buds

Isolation method	% of viable microspore
Blending	49.5±3.9
Pestle maceration in mortar	3.7±0.1
Pestle maceration on sieve	3.0±1.1

Data are based on observations of 200~300 microspore for each replication and three replications for each treatment.

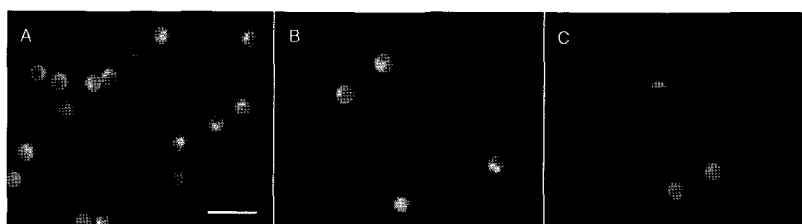


Figure 2. FDA test for microspores isolated using different method. (A) blending, (B) pestle maceration in a mortar, (C) pestle maceration on sieve. Viable microspores show an intense fluorescence. The scale bar (10 μm) in (A) applies to all the figures.

의 꽃봉오리로부터 소포자를 나출하여 3회 수세한 후에 수확한 소포자의 양은 막자사발이나 체를 이용한 maceration 시에 비해 blender를 사용하였을 때 많았으며, 소포자를 나출하여 동일한 방법으로 수세하여 수확하는 경우 blending 시에는 소포자 현탁액에 체세포조직의 찌꺼기들이 거의 없었으나 막자사발이나 체를 이용한 maceration 시에는 체세포조직의 찌꺼기들이 많이 남아있었다 (성적 미제시). 따라서 소포자의 활력, 수확되는 소포자의 양 그리고 소포자 현탁액에 남아 있는 체세포조직의 찌꺼기들로 보아 사용한 3가지 방법 중 blender를 이용하는 방법이 가장 좋은 것으로 나타났다.

소포자를 나출하는 방법에는 밀이나 큰조아재비에서처럼 maceration하는 방법 (Cistué et al. 2006, Guo and Pulli 2000), 사과에서처럼 maceration하되 체 위에서 하는 방법 (Höfer et al. 1999), 옥수수에서와 같이 blender를 이용하는 방법 (Pescitelli 1990), 사과에서처럼 stirring (Höfer et al. 1999)하는 방법, 그리고 밀에서처럼 vortexer를 이용하는 방법 (Hu et al. 1995) 등 식물에 따라 나출에 적합한 방법이 다르다. 고추의 경우 stirring이나 vortexing 방법은 약이 쉽게 벌어지지 않아 사용하기 어려우므로 blender를 이용하는 방법, 막자사발을 이용한 maceration 방법, 그리고 체를 이용한 maceration 방법의 3가지를 사용한 결과 blender를 이용하는 경우 비교적 용이하게 소포자를 나출 시킬 수 있었다. 또 꽃봉오리를 blending하여 약을 절단 시킨 후 약내에 남아있는 소포자를 나출시키기 위해 vortexing함으로서 단 시간에 많은 소포자를 수확할 수 있었으며, 시간과 속도를 조절함으로써 반복성 있는 결과를 얻을 수 있어 사용한 방법 중 가장 효율적임을 밝힐 수 있었다.

소포자의 활력은 나출방법에 따라 크게 달라지는데, 큰조

아재비의 경우 maceration 방법에 비해 blending할 때 높으며 (Guo and Pulli 2000), 옥수수의 경우에도 homogenizer 사용 시에 비해 blender사용 시에 높다 (Pescitelli et al. 1990). 이외에 밀 (Gustafson et al. 1995)이나 보리 (Lok Olsen 1991)에서도 blender 사용 시에 활력 있는 소포자의 비율이 높다. 본 연구에서도 활력 있는 소포자의 비율이 체와 막자사발을 이용한 maceration 시에는 3% 전후로 매우 낮았으나 blender 사용 시에는 49.5%로 13배 이상 높았다. 이는 maceration 시에는 소포자 나출에 소요되는 시간이 길고 조직이 뭉그러짐으로 인해 소포자에 가해지는 stress가 많으나 blending 시에는 꽃봉오리와 약 조직을 단 시간에 예리하게 절단할 수 있어 stress를 감소시킬 수 있었기 때문인 것으로 생각된다.

배의 발생에 미치는 배지의 영향

소포자배양 시 배지의 조성이 배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 전처리가 끝난 소포자를 무기물은 FWIB와 MMS3 배지의 것 2가지를, 유기물은 FWIB, MMS3 및 NLNS 배지의 3가지 것을 사용하여 조합한 6가지 즉 FF, FN, FM, MF, MN, 및 MM 배지에 배양하여 4주 후 배의 발생과 발달을 조사한 결과 FWIB의 무기물을 사용한 배지에서 발생한 배는 MMS3 무기물을 사용한 배지에 비해 길이가 길고 비대한 것들이 많았으며 구형 시기의 배들도 비교적 컸다. 또 FF과 FM 배지에서는 뿌리가 발달한 배들도 있었다. 이에 비해 MMS3의 무기물을 사용한 배지에서 발생한 배는 길이가 짧고 가늘었으며 구형배의 크기도 작았고 뿌리의 발생도 없었다 (Figure 3).

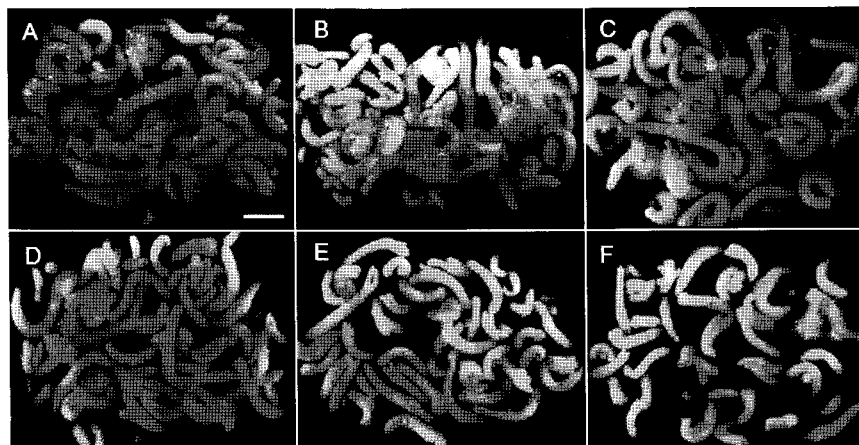


Figure 3. Embryos developed from microspores cultured in different media. (A) FF, (B) FN, (C) FM, (D) MM, (E) MN, (F) MF. Embryos were observed after 4 weeks of culture under the stereo microscope (10 x). The scale bar (3 mm) in (a) applies to all the figures.

FWIB의 무기물을 사용한 FF, FN 및 FM 배지 중 배의 발생은 FN 배지에서 54.4개로 가장 많았으며 그 다음은 FF 배지와 FM 배지 순으로 34.5개와 32.5개였다. 자엽배의 발생도 FN 배지에서 9.2개로 가장 많았고 다음은 FM 배지와 FF 배지 순으로 5.3개와 5.1개였다 (Table 3). 따라서 배의 발생이나 발달 모두 FN 배지에서 가장 좋은 것으로 나타났다. 한편 MMS3의 무기물을 사용한 MF, MN, 및 MM 배지 중 배의 발생은 MN 배지에서 49.2개로 가장 높았으며 그 다음은 MM 배지와 MF 배지 순으로 48.5개와 34.9개였다. 자엽배의 발생도 MN 배지에서 10.1개로 가장 많았고 그 다음은 MF 배지와 MM 배지 순으로 각각 8.7개와 8.5개였다 (Table 3). 따라서 배의 발생이나 발달 모두 MN 배지에서 가장 좋은 것으로 나타났다. 이와 같이 FWIB나 MMS3 배지의 무기물을 사용한 경우 모두 유기물로 NLNS를 사용한 배지인 FN과 MN 배지에서 배의 발생과 발달이 좋았다. 또 FN과 MN 배지 중 배의 발생은 FN 배지에서 높았으나 자엽배의 발생은 MN 배지에서 높았고 FN 배지에서 발생한 배들은 비정상적으로 비대하였다.

소포자배의 발생은 배지의 종류에 따라 크게 영향을 받는데 식물에 따라 배의 발생에 적합한 배지가 다르다. 비교적 소포자배양이 잘 되는 식물로 알려진 유채에서는 NLN 배지 (Baillie et al. 1992), 밀에서는 MMS3 배지 (Hu and Kasha 1997), 그리고 보리에서는 FWIB 배지 (Li and Devaux 2001)가 널리 사용되고 있다. 그러나 실험에 따라서는 기존에 사용하던 배지의 일부를 수정하여 사용하기도 하며 (Chu and Hill 1988; Hu and Kasha 1997), 서로 다른 배지의 무기물과 유기물을 조합하여 사용하기도 한다. 사과와 경우 N6의 무기물 다량원소, MS의 무기물 미량원소 및 B5의 vitamin을

조합하여 만든 AT3 배지에서 다세포체의 발생이 높으며 (Höfer et al. 1999), 밀의 경우 1/2 N6의 무기물 다량원소에 1/2 B5의 무기물 미량원소와 vitamin을 조합한 A2 배지 사용시 다수의 다핵체와 구형배가 발생 한다 (Touraev et al. 1996). 본 실험에서도 고추의 소포자배양 시 배의 발생 및 발달에 적합한 배지를 찾기 위해 보리, 밀 및 유채의 소포자배양 시 사용되고 있는 FWIB, MMS3 및 NLNS 배지의 무기물과 유기물을 조합하여 사용한 결과 발생한 배의 전체 수는 FN 배지에서 가장 많았으며 다음은 MN 배지에서 많았으나 정상 자엽배의 발생은 MN 배지에서 가장 많았으며 FN 배지에서 발생한 배는 비정상적으로 길고 비대하여 사용한 배지 중 고추의 소포자배양에 적합한 것은 MN 배지인 것으로 나타났다.

배양 광조건이 배의 발생에 미치는 영향

소포자배양 시 배양 광조건이 배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 5주 간 계속 암배양 하거나 암상태에서 각각 2, 3 또는 4 주 배양한 다음 다시 광 상태의 배양기로 옮겨 3, 2 또는 1주 더 배양한 후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 배의 발생은 4주간 암배양 한 후 1주간 광배양 하는 경우에 45.3개로 가장 많았고 다음은 5주간 암배양 했을 때 42.5개였다. 3주간 암배양 후 2주간 광배양 하는 경우와 2주간 암배양 후 3주 간 광배양 하는 경우에는 각각 41.0개와 33.3개로 암배양 기간이 길 때 높았다. 자엽배의 발생도 4주간 암배양 후 1주간 광배양 하는 경우 20.1개로 가장 많았고 다음은 5주 간 암배양 했을 때 18.6개였다. 3주간 암배양 후 2주간 광배양 하는 경우와 2주간 암배양 후 3주 간 광배양 하는 경우에는 각각 16.5개와 13.1개로 암배양 기간이 길 때 높았다 (Table 4).

Table 3. Influence of culture medium on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper

Medium	No. of embryos/plate			
	globular & heart	cotyledonary & torpedo	ELS ^a	Total
FF	3.8±2.4	5.1±2.5	25.5±6.0	34.5±9.1
FN	9.4±3.7	9.2±3.3	35.8±5.9	54.4±8.9
FM	3.1±1.3	5.3±2.5	24.4±3.4	32.5±4.8
MM	12.1±9.6	8.5±6.1	27.8±18.6	48.5±33.5
MN	6.9±5.5	10.1±5.8	34.7±15.7	49.2±27.1
MF	6.5±4.1	8.7±5.9	21.7±12.9	34.9±23.8

^aELS indicates embryo-like structure. Values are the means of three independent experiments with 6 replicates for each treatment. Every plate contains approximately 150,000 microspores.

Table 4. Influence of light culture period on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper

Culture period in dark/light (wk)	No. of embryos/plate			
	globular & heart	cotyledonary & torpedo	ELS ^a	Total
2/3	4.3±2.5	13.1±3.4	18.0±11.3	33.3±17.4
3/2	4.3±1.9	16.5±4.8	20.2±9.8	41.0±10.9
4/1	1.9±1.0	20.1±4.0	23.1±7.3	45.3±10.4
5/0	0.7±0.5	18.6±5.0	23.2±8.3	42.5±9.7

^aELS indicates embryo-like structure. Values are the means of four independent experiments with 4 replicates for each treatment. Every plate contains approximately 150,000 microspores.

광배양 기간이 3주와 2주인 경우에 발생한 배들은 갈색을 띠었으며 길이가 다소 짧았다 (Figure 4). 또 이들을 재분화 배지에 이식하는 경우 유식물체로 발달하는 비율이 매우 낮았다. 5주간 암배양 시에 발생한 배들과 4주간 암배양 후 1주간 광배양 한 경우에 발생한 배들을 재분화 배지에 이식하면 유식물체로의 발달은 암배양 4주 후 광 상태로 옮겨 배양한 배들에서 더 용이하게 일어났다 (성적 미제시). 따라서 배의 발생 및 발달과 재분화 배지에 이식 후 유식물체로의 발달에 적합한 배양 조건은 4주간 암배양 한 후 1주간 광배양 하는 것으로 나타났다.

동백의 소포자 배양에서와 같이 암 상태에서는 1~2회의 분열만 일어나며 광 상태에서 배양 시 proembryo가 형성되는 경우도 있으나 (Pedroso and Pais 1994) 밀, 보리, 유채 등에서와 같이 대부분 식물의 소포자배양은 암 상태에서 이루어진다 (Luckett and Darvey 1992, Palmer et al. 1996). 본 연구에서도 배의 발생이나 발달 모두 4주간 암배양 한 후 광조건으로 옮겨 1주 더 배양했을 때 가장 높았고 다음은 5주간 암배양 시에 높아 4주 이상 암배양 하는 것이 효과적인 것으로 밝혀졌다.

유채의 소포자배양 시 배양 초부터 희미한 광 조건에서 배양하면 20일 후 녹색의 배가 발생하며 (Gland et al. 1988), 밀의 약배양 시에도 배양 초부터 1,500 lux의 광 조건에서 배양하면 배가 발생 한다 (Chu and Hill 1988). 한편 유채에서는 암 상태에서 배양한 2주 후부터 광 상태로 옮겨 배양하면 구형 및 어뢰형 시기의 배들이 녹색의 정상 자엽배들로 발달 한다 (Ilić-Grubor et al. 1998). 그러나 본 연구 결과 광배양 기간이 2주 이상인 경우에는 발생한 배의 전체 수와 자엽배의 수가 적었을 뿐만 아니라 배가 갈변되었는데 이는 본 실험 시 생장기의 광도가 4,500 lux로 비교적 높았기 때문인 것으로 생각된다.

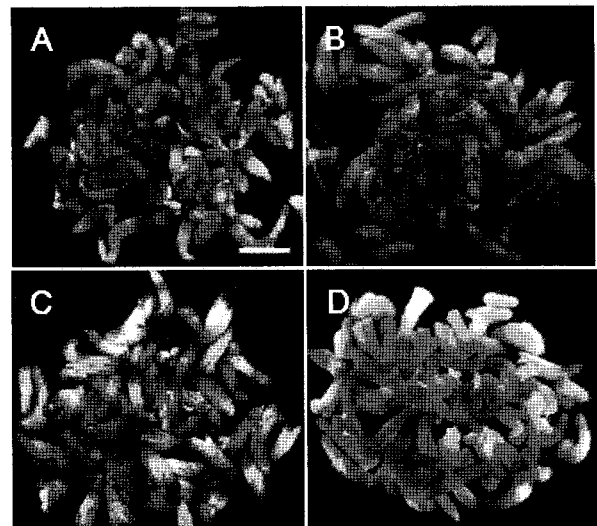


Figure 4. Embryos developed from microspores after 5 weeks of culture in NLNS medium which had been differentially exposed to the light. (A) 2 weeks in dark/3 weeks in light, (B) 3 weeks in dark/2 weeks in light (C) 4 weeks in dark/1 week in light (D) 5 weeks in dark. The scale bar (3 mm) in (a) applies to all the figures.

적 요

효율적이며 반복성 있는 고추의 소포자배양 시스템을 확립하기 위해 꽃봉오리로부터 소포자의 수확 시 나출 방법이 소포자 활력에 미치는 영향을 조사하는 동시에 모 식물 생육 시의 광도, 치상배지의 조성, 및 배양 광 조건이 배의 발생 및 발달에 미치는 영향을 조사하였다. 광도가 10,000 lux와 5,500 lux로 각기 다른 곳에서 모식물이 생육된 경우 활력 있는 소포자의 비율은 큰 차이가 없었으며, 소포자 배의 발생이나 발달은 저광도인 5,500 lux에서 생육된 경우에 다소 높아 모 식물 생육 시의 광도가 소포자배의 발생에 미치는 영향이 크지 않은 것으로 나타났다. 그러나 5,500 lux에서

생육된 식물에서는 꽃봉오리의 수가 적어 배양에 필요한 소포자를 준비하기가 매우 어려웠다. 활력 있는 소포자의 비율은 체나 막자사발을 이용한 maceration 방법에 비해 blender를 이용하는 경우 13배 이상 높았다. 배의 발생 및 발달에 가장 좋았던 배지는 사용한 배지 중 MN배지였으며, 배양 광 조건은 암 상태에서 배양한 4주 후에 다시 광 상태로 옮겨 1주 배양하는 것이었다. 이상에서와 같은 결과들은 고추에서 형질전환이나 돌연변이 연구에 이용될 수 있을 정도로 많은 배를 생산할 수 있는 소포자 배양 시스템을 확립하는데 중요한 기초 자료가 될 것이다.

사 사

이 논문은 2005년도 정부 (과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (R01-2005-000-10338-0)

인용문헌

- Afele JC, Kannenberg LW, Keats R, Sohota S, Swanson EB (1992) Increased induction of microspore embryos following manipulation of donor plant environment and culture temperature in corn (*Zea mays* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 28: 87-90
- Baillie AMR, Epp DJ, Hutcheson D, Keller WA (1992) In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. *Plant Cell Rep* 11: 234-237
- Bárány I, Testillano PS, Mityko J, Risueno MC (2001) The switch of the microspore developmental program in Capsicum involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *Int J Dev Biol* 45(S1): S39-S40
- Buyukalaca S, Comlekcioglu N, Abak K, Ekbic E, Kilic N (2004) Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions of production of Pepper (*Capsicum annum* L.) haploid embryos via anther culture. *Eur J Hort Sci* 69: 206-209
- Chu CC, Hill RD (1988) An improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryoids in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci* 55: 175-181
- Cistué L, Soriano M, Castillo AM, Vallés MP, Sanz JM, Echávarri (2006) Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 25: 257-264
- Datta S (2001) Androgenesis in cereals. In: Bhojwani and WY Soh (eds) *Current trends in the embryology of angiosperms*. Kluwer, The Netherlands, pp 471-488
- Davies PA, Morton S (1998) A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. *Plant Cell Rep* 17: 206-210
- Dunwell JM (1976) A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. *Env Exp Bot* 16: 109-118
- Gland A, Lichter R, Schwelger HG (1988) Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L. *J Plant Physiol* 132: 613-617
- Guha S, Maheshwari SC (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 4957: 497
- Guo YD, Pulli S (2000) An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in timothy (*Phleum pratense* L.). *Plant Cell Rep* 19: 761-767
- Gustafson VD, Stephen Benziger P, Wright MS, Stroup WW, Yen Y (1995) Isolated wheat microspore culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 42: 207-213
- Hansen M, Svinnset K (1993) Microspore culture of swede (*Brassica napus* ssp. *rapifera*) and the effects of fresh and conditioned media. *Plant Cell Rep* 12: 496-500
- Heslop-Harrison JS (1970) Cytological techniques to assess pollen quality. In: Cresti M, Tiezzi A (eds) *Sexual plant reproduction*. Springer-Verlag, Berlin, pp 41-48
- Höfer M, Touraev A, Heberle-bors E (1999) Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. *Plant Cell Rep* 18: 1012-1017
- Hu T, Kasha KJ (1997) Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Rep* 16: 520-525
- Hu TC, Ziauddin A, Simion E, Kasha KJ (1995) Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined media I. Effects of pretreatment, isolation methods, and hormones. *In vitro Cell Dev Biol* 31: 79-83
- Ilić-Grubor K, Attree SM, Fowke LC (1998) Induction of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethylene glycol (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium. *Plant Cell Rep* 17: 329-333
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR (2001) An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica* 120: 379-385
- Kasperbauer MJ (1970) Photo- and thermo-control of flowering in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Agron J* 62: 825-827
- Kameya T, Hinata K (1970) Induction of haploid plants from pollen grains of Brassica. *Jpn J Breed* 20: 82-87
- Keller WA, Armstrong KC, de la Roche AI (1983) The production and utilization of microspore-derived haploids in Crassica crops. In: Sen SK, Giles KL (eds) *In Plant cell culture in crop improvement*. Plenum Press, New York,

- pp 169-183
- Kernan Z, Ferrie AMR (2006) Microspore embryogenesis and the development of a double haploidy protocol for cow cockle (*Saponaria vaccaria*). *Plant Cell Rep* 25: 274-280
- Kim M, Kim J, Yoon M, Chio D, Lee KM (2004) Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*) *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77: 63-72
- Kim M, Jang I, Kim J, Park E, Yoon M, Lee Y (2007) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant cell Rep* 10.1007/s00299-007-0442-4
- Kuhlmann U, Foroughi-Wehr B (1989) Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. *Plant Cell Rep* 8: 78-81
- Kyo M, Harada H (1990) Specific phosphoproteins in the initial period of tobacco pollen embryogenesis. *Planta* 182: 58-63
- Li H, Devaux P (2001) Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep* 20: 475-481
- Lok Olsen F (1991) Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas* 115: 255-266
- Luckett DJ, Darvey NL (1992) Utilisation of microspore culture in wheat and barley improvement. *Aust J Bot* 40: 807-828
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Palmer CE, Keller WA, Arnison PG (1996) Experimental haploidy in *Brassica* species. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, vol 2. Kluwer, The Netherlands, pp 143-172
- Park E, Kim J, Lee J, Jang I, Yoon M, Chumg S, Kim M (2005) The influence of pretreatment period, 2-hydroxynicotinic acid, and anther co-pretreatment on embryo induction in isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L. *Kor J Plant Biotech* 32: 37-44
- Pedroso MC, Pais MS (1994) Induction of microspore embryogenesis in *Camellia japonica* cv. *Elegans*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 37: 129-136
- Pescitelli SM, Johnson CD, Petolino JF (1990) Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. *Plant Cell Rep* 8: 628-631
- Raina Sk, Irfan ST (1998) High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice. *Plant Cell Rep* 17: 957-962
- Regner F (1996) Anther and microspore culture in *Capsicum*. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, vol 3. Kluwer, The Netherlands, pp 77-89
- Shariatpanahi ME, Belogradova K, Hessamvaziri L, Heberle-Bors E, Touraev A (2006) Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores with stress pretreatment. *Plant Cell Rep* 25: 1294-1299
- Shtereva LA, Zagorska NA, Dimitrov BD, Kruleva MM, Oanh HK (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell Rep* 18: 312-317
- Siebel J, Pauls KP (1989) A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 78: 473-47
- Swanson EB (1990) Microspore culture in *Brassica*. In: Pollard JW, Walker JM (eds) *Methods in molecular biology*, vol 6. Plant cell and tissue culture. Humana Press, New Jersey, pp 159-170
- Testillano PS, Gonzalez-Melendi P, Ahmadian P, Fadon B, Risueno MC (1995) The immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. *Exp Cell Res* 221: 41-54
- Thurling N, Chay PM (1984) The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus* ssp. *oleifers*. *Annals Bot* 54: 681-693
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex Plant Reprod* 9: 209-215

(접수일자 2007년 10월 29일, 수리일자 2007년 11월 26일)