

양성자 및 감마선을 처리한 유채 M₂ 세대의 소포자로부터 반수체 배발생

김광수[†] · 이미양 · 장영석 · 박윤정 · 방진기

농촌진흥청 작물과학원 목포시험장

Production of Haploids from Proton Ion and Gamma-Ray Irradiation Treated M₂ Generation of Isolated Microspores in *Brassica napus* L. ssp. *oleifera*

Kwang-Soo Kim[†], Mei-Yang Li, Young-Seok Jang, Yoon-Jung Park, and Jin-Ki Bang

Mokpo Experiment Station, National Institute of Crop Science, Muan 534-833, Korea

ABSTRACT This experiment was carried out to investigate the effect of proton ion and gamma-ray irradiation on microspore culture of the flower buds of M₂ generation in winter type of *Brassica napus* L. ssp. *oleifera*. The seeds of three rape varieties, 'Halla', 'Naehan' and 'Tammi' were pretreated with proton ion and gamma-ray 400 Gy and 600 Gy, respectively. When microspore culture techniques were used, embryogenesis was increased in some varieties by proton ion and gamma-ray irradiation treated flower buds of M₂ generation than control. In genotypes 'Naehan' showed the highest embryo production frequency, but 'Tammi' showed lowest embryo production frequency. Some of the embryoids developed directly into plantlets, whereas others developed abnormally multilobe. Plants were regenerated and successfully acclimatized in pots.

Keywords : *Brassica napus*, mutagenesis, microspore culture, proton ion, gamma-ray irradiation

최근 원유가격의 상승과 화석연료의 사용으로 인한 지구 온난화 문제와 함께 환경파괴가 심화되어 환경친화적인 바이오에너지와 같은 대체에너지의 필요성이 대두되었고, 유채유 등 식물성기름이 원료가 되는 바이오디젤 연료에 대한 관심이 높아지고 있다. 바이오디젤을 제조하기 위하여 사용되는 유채유는 점도가 비교적 낮고, 포화지방산도 적게 포함되어 있어 온도가 낮은 겨울철에도 비교적 안전하게 사용할 수 있어 유채가 바이오디젤 생산용 원료작물로 관심이 높아지고 있다. 바이오디젤을 생산하여 보급하는데 있어서 경제성이 확보되어야 하는 것이 무엇보다 중요하기 때문에

바이오디젤 원료작물의 단위면적 당 수량이 많아야 하며 바이오디젤의 주성분인 올레인산(C 18:1) 함량이 높은 품종의 개발이 시급하다. 유채와 같은 타식성 작물의 경우 수량의 증대는 웅성불임을 통한 1대 잡종 개발이 효과적(Jang *et al.*, 2002)이고 또한 지방산 조성의 변화에 의한 올레인산 함량 증가는 방사선을 이용한 돌연변이 육종이 효과적(Lee *et al.*, 1984)이라는 것이 알려져 있다.

식물 육종분야에서 돌연변이체의 이용은 단간, 조숙, 내한성, 내병성과 같은 특성을 개량(Kwon, 1985)하는데 사용되며, 대사산물의 생합성 기작을 조절하여 지방산과 같은 화합물의 합성을 인위적으로 조절하는데도 사용된다. 식물 돌연변이 육종은 Stadler(1928)가 보리에 방사선을 처리하여 인위적으로 돌연변이를 일으킬 수 있다는 사실을 밝혀낸 이후, Gustaffsson(1941)이 golden barley에 방사선을 조사하여 유용한 돌연변이 계통을 선발하였다. IAEA의 보고에 따르면 현재 돌연변이 방법에 의해 육성된 품종은 약 2,400여 품종에 이르고 있으며 한국에서도 참깨, 보리, 벼, 콩 등에서 20여개 품종이 이미 개발되어 있다(Lee *et al.*, 2003). 지금까지 돌연변이 육종에 주로 이용되고 있는 변이 유기수단으로는 감마선, X-선, 중성자, 화학약품(Ethyl Methan Sulfonate, N-ethyl-N-nitro-ureum)등이 있다(Lee *et al.*, 2006; Eun *et al.*, 2007).

소포자 배양에 의한 반수체 생산은 열성돌연변이체가 즉시 나타나므로 열성특징을 미리 억제할 수 있으며, 염색체의 배가로 빠르게 동형접합체를 얻을 수 있으므로 육종년한을 크게 단축할 수 있는 장점이 있다(Loh & Ingram, 1983). Guha와 Maheshwari(1964)가 *Datura innoxia*의 약배양에 의해 소포자 유래의 반수체 획득에 성공한 이래로, Thomas & Wenzel(1975)에 의해 처음으로 *Brassica*속에서 약배양

[†]Corresponding author: (Phone) +82-61-450-0133

(E-mail) ajuga@rda.go.kr <Received August 24, 2007>

으로부터 소포자를 분리하여 반수체식물의 생산에 성공하였고, Keller 등(1975)에 의해서도 소포자 배양에 의한 반수체 배발생에 성공하였다. 유채는 소포자 배양이 비교적 간편하고 반수체 유기율도 높으며, 약배양보다 약 10배 정도의 배발생 빈도가 높아 현재 육종기법으로 많이 이용되고 있다(Siebel & Pauls, 1989).

따라서 본 연구는 유채의 유용한 형질인 조숙, 단간, 내한성, 내병성 및 고 올레인산 특성을 지닌 계통을 조기에 육성하고자 양성자와 감마선을 조사한 M₂세대의 소포자 배양에 의한 반수체 생산효율을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

양성자 및 감마선 처리

농촌진흥청 작물과학원 목포시험장에서 육성한 추파형의 '내한', '한라', '탐미' 등 3 품종의 유채 건조종자에 양성자와 감마선 등의 방사선을 처리를 하였다. 양성자는 한국원자력연구원이 보유하고 있는 MC-50 Cyclotron을 이용하여 35.7 MeV, 10~20 nA의 에너지 조건에서 10.5 mm Be target으로부터 1.8~3.6 Gy·s⁻¹의 선량률로 10 cm 떨어진 위치에서 조사시간을 달리하여 선량을 400, 600 Gy로 처리하였다. 감마선은 한국원자력 연구소의 저준위조사시설 (⁶⁰Co)을 이용하여 선량률 1.38~27.8 Gy·h⁻¹로 총 조사선량은 양성자와 동일하게 하였다.

소포자 분리 및 식물체 분화

2005년 10월 5일에 방사선 조사한 종자를 파종하여 M₁세대에서 자가수정한 종자를 채종하여 2006년 10월 25일에 파종하여 M₂세대를 전개하는 과정의 식물체가 본엽이 7~8매 정도 전개될 때까지 육묘 후 2007년 1월에 비닐하우스에 정식하고 하우스 온도를 20-25°C/10°C(주/야)로 조절하여 식물체를 육성하였다. 각 품종 및 방사선 처리별로 꽃이 1-9 개 정도 개화하기 시작할 때의 화서를 채취하여 화퇴의 길이를 2.0-2.5 mm, 2.5-3.0 mm, 및 3.0-3.5 mm의 3개 집단으로 나누어, 이들 각각 집단으로부터 20개 정도의 화퇴를 70%의 EtOH에 30초간 소독한 다음 Tween 20을 1-2방울 첨가한 1%의 NaClO용액에 15분간 표면살균한 후 멸균수로 4회 세척하였다. 살균된 화퇴를 비커에 넣고 13%의 sucrose가 첨가된 B5배지(Gamborg *et al.*, 1968) 10 ml를 첨가한 후 균질기로 화퇴를 으깨어 소포자를 분리하여 42 µm의 nylon mesh로 여과하고 15 ml의 falcon tube에 담아 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 1 ml

의 B5배지로 현탁한 후 활력이 높은 소포자만을 분리하기 위하여 24/32/40%의 percoll을 각각 2 ml씩 농도에 따라 15 ml의 falcon tube에 층을 이루도록 넣은 후 소포자 현탁액 1 ml를 밀도 상층에 조심스럽게 주입하고 1,000 rpm에서 5분 원심분리 한 후 32%의 percoll층에 분리된 소포자만을 파스퇴르피펫을 이용하여 수집하였다. 이 분획에 5 ml의 B5배지를 가하여 현탁시킨 후 0.1 ml을 취하여 혈구계수기(haemocytometer)를 이용하여 소포자의 밀도를 측정하고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 상층액은 버리고 침전된 소포자들을 13%의 sucrose와 1 mg/l NAA와 0.05 mg/l BA가 함유된 NLN 배지(Nitsch & Nitsch, 1967)로 소포자 밀도가 5×10⁴/ml가 되도록 현탁하여 35 mm × 10 mm의 배양접시에 3 ml씩 분주하여 32.5°C의 암상태에서 3일간 배양한 후, 25°C 암상태로 옮겨서 지속 배양하였다.

배양 4주 후 형성된 소포자배를 100 ml의 삼각플라스크에 30 ml의 NLN 배지에서 100 rpm으로 현탁배양을 하였다. 형성된 배는 MS(Murashige & Skoog, 1962) 고체배지에 치상하여 25°C에서 16 h/day 광주기로 배양하였다. 새로 형성된 다량의 싹초를 4주 간격으로 동일한 배지로 계대배양을 하였다.

결과 및 고찰

농촌진흥청 작물과학원 목포시험장에서 육성한 추파형의 유채인 '내한', '한라', '탐미' 등 3품종의 종자를 2005년에 양성자와 감마선을 처리하여 수확한 종자(M₁)를 2006년에 파종하여 M₂세대를 전개하는 과정의 식물체 소포자를 배양하여 양성자와 감마선 처리 및 처리 양에 따른 영향, 품종간 차이 그리고 품종별 화퇴 크기에 따른 배발생 반응을 비교 조사하였다.

그림 1은 화퇴로부터 분리한 소포자의 배양과정으로, 분리한 소포자(A)를 32.5°C의 고온에서 3일간 암배양한 후 첫 번째 세포분열이 발생한 사진이며(B), 계속하여 온도를 25°C로 낮추어 암배양하면 배양 7-10일경부터 세포가 활발히 분열하여(C) 구형의 초기 구형배가 형성되기 시작하여(D) 육안으로 관찰이 가능하였다. 배양 3-4주 후에는 점차 자엽과 배축 및 뿌리가 형성(E, F)되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 Bang 등(1991)과 Park 등(2006)이 보고한 추파품종인 유채 소포자 배양에서의 배 생육 속도와 거의 일치한 결과를 보였다.

소포자 배양 4주 후에 배상체 발생수를 조사한 결과는 표 1과 같다. '한라'와 '내한' 유채에서 배상체 발생 빈도가 높

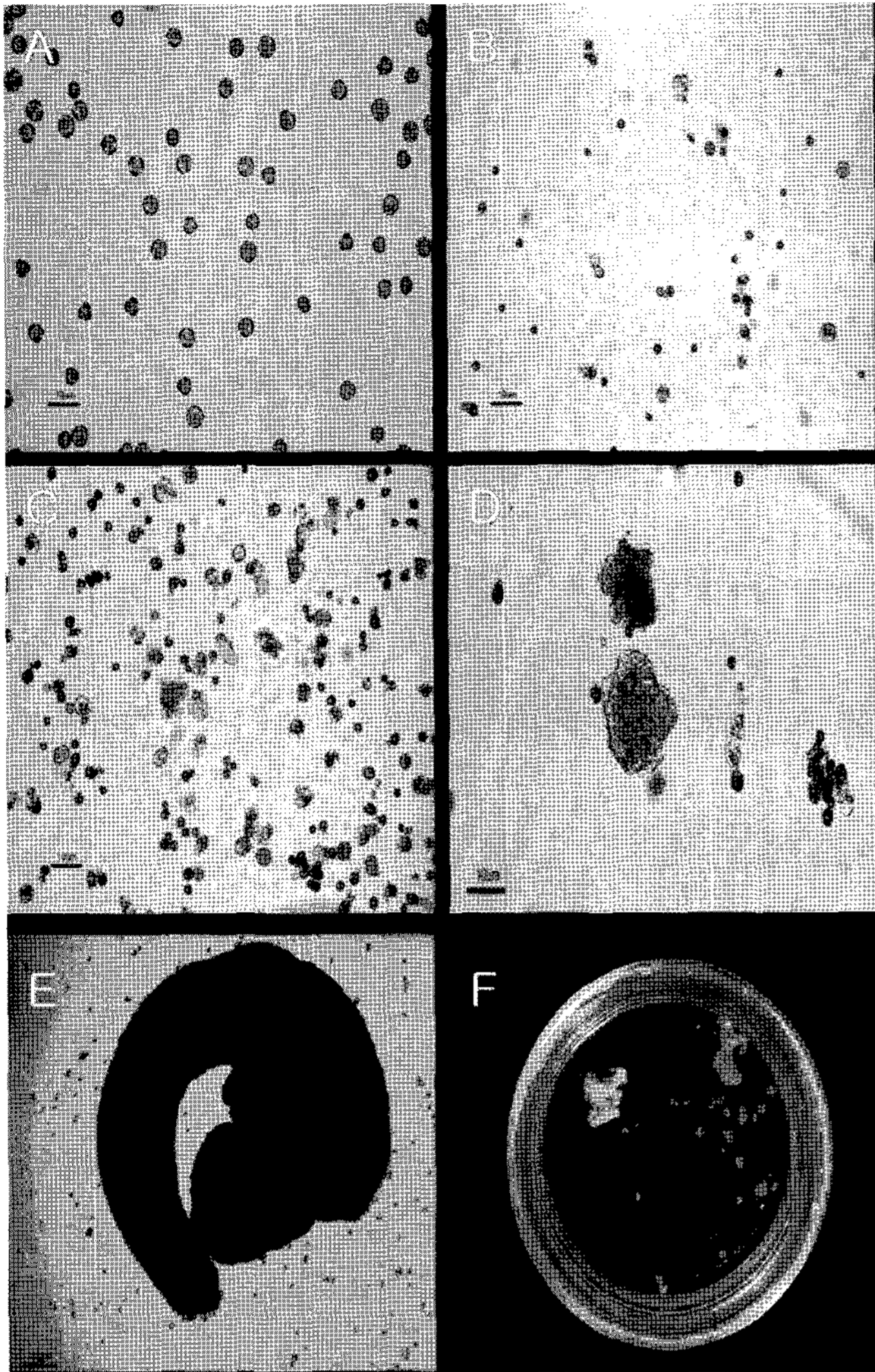


Fig. 1. Induction of embryogenesis from isolated microspores culture of *B. napus* L.

A: Freshly isolated microspores. Bar = 10 µm; B: First cell division in microspores after 3 days in cultured at 32.5°C, Bar = 10 µm; C and D: Cell clusters formation after 7 days in cultured at 25°C, Bar = 10 µm; E: Torpedo embryos formation after 4 weeks in cultured at 25°C, Bar = 10 µm; F: Cotyledonary embryo morphology after 4 weeks in cultured at 25°C.

았는데, 품종 간 전체적인 배상체 발생은 3품종 중 ‘내한’ 유채가 가장 높았고 ‘탐미’ 유채는 겨우 1-2개의 배상체를 형성하여 배상체 발생 빈도가 가장 저조하였다. 화뢰의 크기에 따른 배상체 발생 빈도를 보면 ‘한라’는 2.5-3.0 mm의 화뢰 크기에서 배상체 발생 빈도가 가장 높았지만 ‘내한’은 3.0-3.5 mm의 화뢰 크기에서 배상체 발생 빈도가 가장 높게 나타났다. 따라서 소포자로부터 배상체 발생 효율을 증진하기 위해서는 배상체 발생이 가능한 소포자를 함유하고 있는 화뢰를 정확하고 간편하게 식별할 수 있는 방법이 요구되므로

소포자 배양의 효율이 높은 화뢰를 선택하는 것이 중요할 것으로 생각되었다.

품종별로 보면 ‘한라’ 유채의 경우 양성자 400 Gy 처리구에서 2.5-3.0 mm의 화뢰에서 추출한 소포자에서 396개의 배가 형성되어 모든 실험구 중 가장 높은 배발생 빈도를 보였고, 2.0-2.5 mm의 화뢰와 3.0-3.5 mm의 화뢰에서 추출한 소포자에서는 각각 8개와 5개의 배가 형성되었다. 감마선 처리구에서는 400 Gy 처리구에서 2.0-2.5 mm와 2.5-3.0 mm에서 각각 7개와 6개의 소수의 배상체가 형성되었고, 600 Gy 처리구에서는 2.5-3.0 mm에서만 10개의 배가 형성되었다. 방사선 무 처리구와 양성자 600 Gy 처리구에서는 화뢰크기와 상관없이 배상체 형성이 전혀 일어나지 않았다.

‘내한’ 유채는 감마선 400 Gy를 조사한 처리구의 2.5-3.0 mm 크기의 화뢰에서 350개의 배가 형성되어 같은 품종 내에서 배상체 발생 빈도가 가장 높게 나타났으며, 같은 처리구의 2.0-2.5 mm와 3.0-3.5 mm의 화뢰 크기에서는 각각 4개와 71개의 배가 형성되어, 방사선 무처리구(대조구)의 배상체 발생 수 138, 10 및 180개 보다 더 많은 배를 형성하였다. 감마선 600 Gy 처리에서는 배가 전혀 형성되지 않았다. 양성자 400 Gy 처리구에서는 3.0-3.5 mm 크기, 2.5-3.0 mm 크기와 2.0-2.5 mm 크기에서 각각 204개, 11개와 1개가 형성되어, 600 Gy의 같은 크기 화뢰의 122, 4, 0개 보다 더 많이 형성되었다.

‘탐미’ 유채의 경우 배양 초기에는 세포팽창과 세포분열이 일어나는 것을 관찰할 수 있었지만 세포분열이 거듭되면서 세포가 괴사하여 배지의 상층부에 집단을 이루며 떠 있는 것을 관찰할 수 있었는데 모든 처리구에서 겨우 1-2개의 배상체가 형성되거나 혹은 배상체가 전혀 형성되지 않아 아주 저조한 배상체 형성을 보였다. 이와 같은 결과는 Dunwell 등(1985), Thurling & Chay(1984), Bang 등(1991), Jang 등(1997)과 Park 등(2006)이 *B. napus*에서 공여식물의 화뢰에 uninucleate stage의 소포자를 포함하는 비율이 유전자형, 화뢰의 크기에 따라 차이가 있음을 보고한 것과 같이 품종과 유전자형에 따라 화분핵의 발달단계가 다르고 이에 따라 배상체의 발생 빈도 또한 다른 게 나타난 것으로 생각되었다. 또한 실험결과, 같은 품종이라 할지라도 방사선 처리종류와 처리 양에 따라서도 소포자로부터 배발생 빈도가 큰 차이가 있었다. ‘한라’ 유채의 경우 양성자와 감마선 처리에 따른 배상체 발생 반응을 비교해 보면 양성자 처리구가 감마선 처리구보다 배상체 발생 빈도가 높았으며, 감마선 처리구가 방사선을 조사하지 않은 대조구보다 높게 나왔다.

Table 1. Influence of genotype, irradiation treatment and bud size on the number of embryo and plant regeneration in winter type of *Brassica napus* L.

Genotype	pretreatment	Dose (Gy)	Bud-size	Embryos number	Plant regeneration	
					number	%
Halla	Control	0	2.0-2.5	0	0	0
			2.5-3.0	0	0	0
			3.0-3.5	0	0	0
	P ^z	400	2.0-2.5	8	0	0
			2.5-3.0	396	96	24.1
			3.0-3.5	5	0	0
	600	2.0-2.5	0	0	0	
		2.5-3.0	0	0	0	
		3.0-3.5	0	0	0	
	γ	400	2.0-2.5	7	1	14.3
			2.5-3.0	6	0	0
			3.0-3.5	0	0	0
		600	2.0-2.5	0	0	0
			2.5-3.0	10	0	0
			3.0-3.5	0	0	0
Naehan	Control	0	2.0-2.5	10	0	0
			2.5-3.0	138	0	0
			3.0-3.5	180	18	10.0
	400	2.0-2.5	1	0	0	
		2.5-3.0	11	8	72.7	
		3.0-3.5	204	46	22.5	
	600	2.0-2.5	0	0	0	
		2.5-3.0	4	0	0	
		3.0-3.5	122	0	0	
	γ	400	2.0-2.5	4	2	50.0
			2.5-3.0	350	54	15.4
			3.0-3.5	71	10	14.1
		600	2.0-2.5	0	0	0
			2.5-3.0	0	0	0
			3.0-3.5	0	0	0
Tammi	Control	0	2.0-2.5	0	0	0
			2.5-3.0	0	0	0
			3.0-3.5	0	0	0
	400	2.0-2.5	0	0	0	
		2.5-3.0	0	0	0	
		3.0-3.5	0	0	0	
	600	2.0-2.5	0	0	0	
		2.5-3.0	1	0	0	
		3.0-3.5	2	1	50.0	
	γ	400	2.0-2.5	0	0	0
			2.5-3.0	0	0	0
			3.0-3.5	2	0	0
		600	2.0-2.5	0	0	0
			2.5-3.0	1	0	0
			3.0-3.5	1	0	0

P^z and γ indicates proton ion and gamma-ray, respectively.

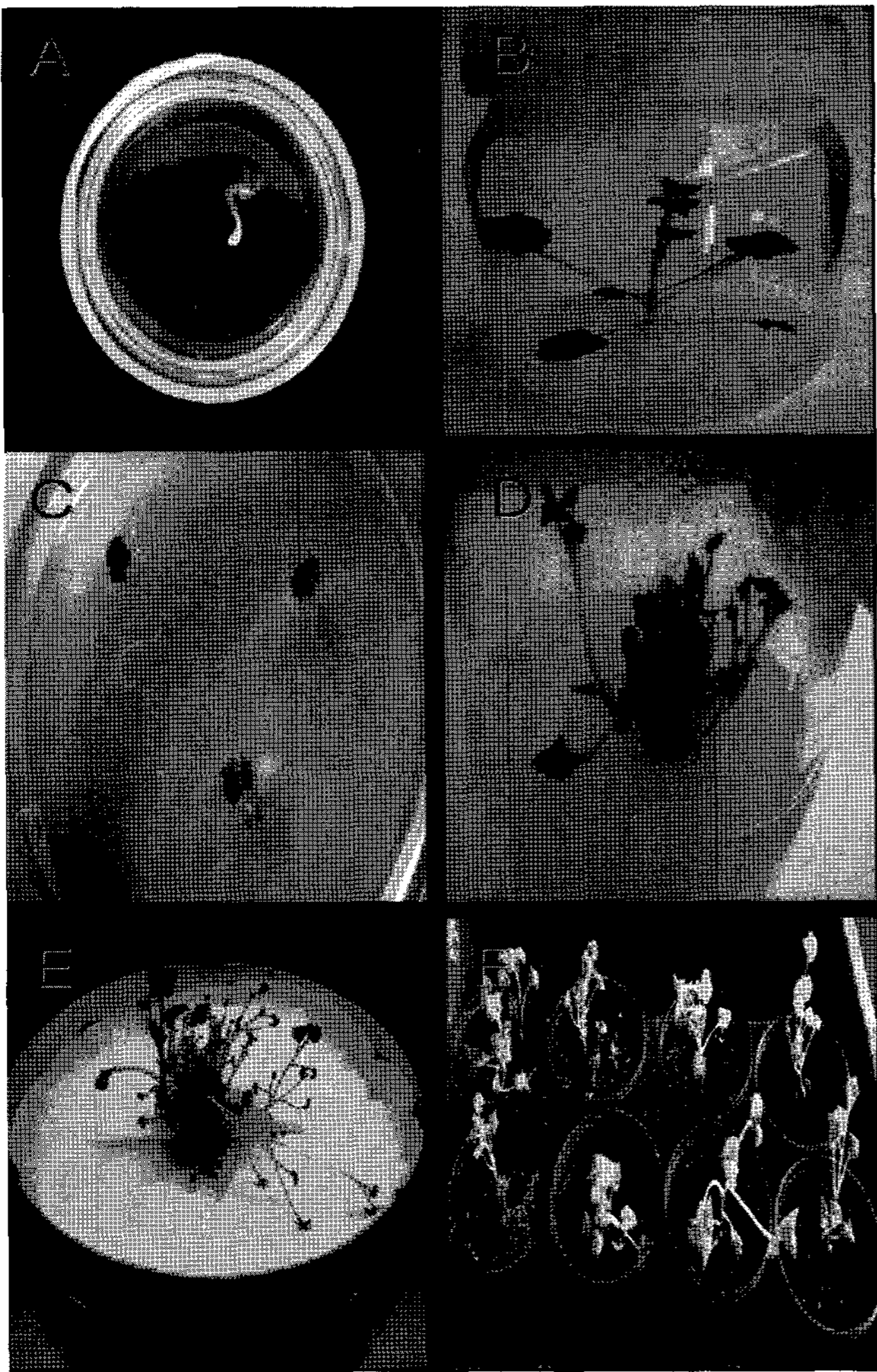


Fig. 2. Process of embryo production, shoot regeneration and acclimatization of *B. napus* L. A: Formation of normal embryo; B: Direct development of embryoids into plantlets from normal embryo; C: Formation of multilobe abnormal embryos; D, E: Multiple shoot formation from multilobe abnormal embryos F: Acclimatized plantlets in soil.

‘내한’ 유채의 경우, 감마선 400 Gy 처리구가 대조구보다 배발생 빈도가 높았으며, 양성자 400 Gy와 600 Gy 처리구는 대조구보다 배발생 빈도가 낮게 나타났다. 양성자와 감마선 처리구에서 모두 400 Gy에서 더 높은 조사량인 600 Gy에서 보다 높은 배상체 발생 빈도를 보여, 일정 양의 방사선 조사는 배상체 발생을 촉진시키지만 그 이상의 방사선 조사는 배상체 발생을 저해한다는 것을 설명한다.

유기된 배상체의 식물체로의 재분화율을 조사한 결과, 배발생은 일어나지만 식물체로 분화되지 못한 처리구에서부터 최고 72.7%(‘내한’ 유채 양성자 400 Gy)까지 완전한 식물체로 분화되는 다양한 양상을 보였다(Table 1). 소포자 배

양을 통해 형성된 배상체(Fig. 2A)를 성장조절제가 첨가되지 않은 NLN 액체배지에서 100 rpm으로 진탕배양을 하여 자엽이 형성되기 시작하면, 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 고체배지에 치상하여 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 배양(16 h / 8 h, 명 / 암)을 하면 아주 드물게 바로 단일 식물체(Fig. 2B)를 형성하였으나, 대부분은 비정상적으로 비대된 multilobe(Fig. 2C)가 발생하면서 다량의 싹초(Fig. 2D, E)가 형성되었다. 형성된 싹초는 기저부에서 절취하여 4주 간격으로 동일한 고체배지에 계대배양을 하면 캘러스 형성 없이 뿌리가 형성되었고 뿌리가 유도된 식물체를 플라스틱 포트에 심어 순화(Fig. 2F)에 성공할 수 있었다.

본 실험을 통해서 적당한 양의 양성자나 감마선 조사가 소포자로부터 배발생 효율을 촉진하는 것으로 밝혀졌으며 이를 통해 다량의 반수체식물을 생산할 수 있어, 이를 유채와 같은 기름작물의 육종에 이용하면 큰 의의가 있을 것이라고 사료된다. 앞으로의 연구는 이렇게 얻은 반수체 식물체를 배가시켜 형성된 종자를 계속 조사 연구하여 양성자나 감마선에 의한 유용한 형질의 돌연변이 유도 수준을 평가하고자 한다.

적 요

양성자와 감마선 조사한 추파형 유채 M₂세대의 화뢰의 소포자 배발생에 대해 조사하였다. 세 가지 유채품종 ‘한라’, ‘내한’과 ‘탐미’ 유채종자를 각각 400 Gy와 600 Gy의 양성자와 감마선으로 전처리 하였다. 일부 종의 양성자와 감마선 조사구에서 배발생이 증가되었고 대조구보다 높았다. 품종별로는 ‘내한’유채가 배발생 빈도가 가장 높았고 ‘탐미’ 유채가 가장 낮았다. 드물게 배상체로부터 바로 소식물체가 형성되었고 대부분은 비정상적으로 multilobe가 형성되었다. 배상체로부터 식물체가 성공적으로 재분화 되었고 화분에 순화되었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 친환경바이오에너지연구사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

Bang, J. K., J. I. Lee, and L. S. Kott. 1991. Embryogenesis and plant regeneration in rapeseed microspore culture. Korean

- J. Breed. 23(3) : 257-262.
- Dunwell, J. M., M. Cornish, and de A. G. L. Courcel. 1985. Influence of genotype, plant growth temperature and anther incubation temperature on microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. J. Exp. Bot. 36 : 679-689.
- Eun, J. S., J. S. Kim, H. S. Lim, S. K. Han, S. R. Choi, and Y. S. Jang. 2007. Effect of Proton Ion and Gamma-Ray Irradiation on Radiosensitivity of M₁ Seedlings in *Brassica napus*. Korean J. Hort. Sci. Technol. 25(1) : 17-23.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and L. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50 : 151-158.
- Guha, S., and S. C. Maheshwari. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature. 204 : 479.
- Jang, Y. S., K. S. Min, Y. B. Oh, and D. H. Chung. 1997. Comparisons of developmental stages of microspore by bud size and embryogenesis from its microspore in *Brassica* species. Korean J. Breed. 29(4) : 480-485.
- Jang, Y. S., C. W. Kim, I. H. Choi, and Y. B. Oh. 2002. Methods of seed production of F₁ Hybrids in *Brassica napus* L. Korean J. Breed. 34(3) : 158-162.
- Keller, W. A., T. Rajhathy, and J. Lacapra. 1975. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris* L. Can. J. Genet. Cytol. 17 : 655-666.
- Kwon, B. S., J. I. Lee, J. I. Lee, and H. J. Park. 1985. Selection of mutants expressed quantitatively in M₂ generation of rapeseed. Korean J. Breed. 17(2) : 193-197.
- Lee, I. S., D. S. Kim, S. J. Lee, H. S. Song, Y. P. Lim, and Y. I. Lee. 2003. Selection and agronomic traits of radiation-induced variants in rice. Korean J. Plant Biotechnol. 30(1) : 19-25.
- Lee, J. I., B. S. Kwon, J. K. Bang, and S. K. Kim. 1984. Breeding for improvement fatty acid composition in rapeseed, *Brassica napus* L.
- Lee, Y. I., S. B. Lee, Y. K. Cho, G. W. Son, J. S. Eun, C. H. Bae, and T. Abe. 2006. Induction and selection of mutants in hot pepper by irradiation with C-12 ion beam. The 10th International Workshop on Accelerator and Beam Utilization. Epitome, Sep. 21-22, p. BU-20.
- Loh, C. S. and D. S. Ingram. 1983. The response of secondary embryoids and secondary embryogenic tissues of winter oil-seed rape to treatment with colchicine. New Phytologist. 95 : 359-366.
- Murashige, E. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
- Nitsch, C. and J. P. Nitsch. 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indicol* L. I. The production of vegetative buds. Planta. 72 : 355-370.
- Park, Y. J., K. S. Kim, Y. S. Jang, C. W. Kim, and J. K. Bang. 2006. Comparison of frequency embryogenesis through microspore culture of domestic cultivars in *Brassica napus* L. Korean J. Crop Sci. 51(S) : 237-241.
- Siebel, J. and K. P. Pauls. 1989. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics. 78 : 473-479.
- Thomas, E. and G. Wenzel. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. Z. Pflanzenzuchtg. 74 : 78-81.
- Thurling, N. and 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*. Annals of Botany. 54 : 681-693.