

# 고추의 소포자 배양 시 전처리 배지, 새 배지의 첨가, 및 배양 용기의 크기가 배의 생산에 미치는 영향

박은준 · 김진애 · 김문자\*  
목원대학교 생명과학과

## Influence of pretreatment medium, fresh medium addition, and culture plate size on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.)

Eun-Joon Park · Jin-Ae Kim · Moonza Kim\*

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

**Abstract** The influences of pretreatment medium, the addition of fresh medium, and the size of culture plate on the production of embryos were investigated in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Among the media used for heat shock pretreatment ( $32\pm 1^\circ\text{C}$ ), high frequency embryo production was obtained when the sucrose-starvation medium A was used. On the other hand, neither 0.37 M mannitol solution nor NLNS medium supplemented with sucrose was not efficient for embryo production. The addition of culture medium to pretreatment media considerably decreased the embryo production even though embryo development proceeded further. The embryo production was not improved by the addition of fresh medium after 2 or 3 weeks from starting culture. Increase in the size of the culture plate from  $3.5\times 1.0$  cm to  $6.0\times 1.5$  cm improved embryo quality. These results will provide valuable information for developing an efficient microspore culture system of hot pepper for high frequency embryo production.

### 서 론

*B. napus*에서 나출 소포자를 배양하여 다수의 배와 식물체를 획득한 이래 (Lichter 1982) 밀 (Hu and Kasha 1997), 보리 (van Bergen et al. 1999), 벼 (Raina and Irfan 1998) 등의 식물에서도 다수의 배와 식물체를 획득할 수 있게 되었다. 나출 소포자들은 반수성인 동시에 단세포 상태이므로 소포자 배양은 반수체 육종은 물론, 우성 또는 열성 돌연변이의 유기 (Swanson et al. 1989; Castillo et al. 2001), 형질전환 (Jähne et al. 1994; Stöger et al. 1995), 분자수준에서의 배 발생 연구 (Testillano et al. 2005) 등에 매우 유용하게 이용될 수 있다. 그러나 이와 같은 장점에도 불구하고 많은 식물들에서 나출 소포자 배양에 성공하지 못하였거나 성공한 식물들에서도 배의 발생이 적어 실제 형질전환이나 돌연변이 유기에 이용되지 못하고 있다.

고추의 경우 소포자 유래의 배와 식물체를 획득하기 위한 방법으로 약배양에 관한 연구는 비교적 많이 이루어졌으며 (Buyukalaca et al. 2004; Mitykó and Fári 1997), 최근에는 shed-microspore culture를 통해 다수의 배와 식물체를 획득할 수 있게 되었다 (Supena et al. 2006). 이에 비해 소포자 배양에 관한 연구는 많지 않으며 대부분의 경우 다세포체를 획득하였을 뿐 다수의 배와 식물체는 획득하지 못하였다 (Regner 1996; Testillano et al. 1995). 최근 본 연구자들은 소포자 배양에 의해 비교적 많은 배와 유식물체를 획득하는데 성공하였다 (Kim et al. 2008; Lee et al. 2007; Park et al. 2005). 그러나 소포자 배양 시스템을 실제 돌연변이 유기, 형질전환체 생산, 반수체 육종 등에 이용할 수 있으려면 배양 효율을 높여 더 많은 배와 식물체를 획득할 수 있어야 한다.

소포자 배양 시 배의 발생은 모식물의 생육조건, 소포자의 발달 시기 및 활력, 전처리 조건, 배지 조성, 배양 조건 등에 의해 크게 영향을 받는다 (Kernan and Ferrie 2006). 이중 전처리 방법이나 조건이 배의 발생에 미치는 영향은 매우 크다 (Oleszczuk et al. 2006). 그 이유는 소포자는 본래 배우체인 화분으로 발달할 것이었는데

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

E-mail: kim70@mokwon.ac.kr

배양에 의해 발달경로를 바꾸어 조포체인 배로 발달하도록 해야하기 때문이다. 즉 소포자 유래의 배를 획득할 수 있으려면 소포자가 배형성 소포자 (embryogenic microspore)로 되어 분열능을 갖게 하는 것이 필요하기 때문이다. 전처리 중 가장 널리 이용되고 있는 방법은 저온이나 고온의 온도처리 (Jähne and Lörz 1995)인데 이때 사용되는 배지의 조성에 따라 배의 발생이 크게 달라진다. 전처리 시 사용되는 배지는 크게 당이 첨가된 것과 첨가되지 않은 것으로 구분할 수 있는데 소포자 배양이 잘되는 식물의 하나인 유채의 경우에는 10% 당이 포함된 NLN 배지에 치상한 후 32-33°C에서 수일 간 고온처리 하여 배양하면 용이하게 배가 발생한다 (Swanson 1990). 뿐만 아니라 고농도의 sucrose (17%)가 첨가된 NLN 배지를 사용하여 32°C에서 48시간 전처리한 후 10% sucrose가 첨가된 NLN 배지에 옮겨 배양하면 배의 발생이 증가된다 (Baillie et al. 1992; Lionneton et al. 2001). 한편 담배, 밀, 보리와 같은 식물들에서는 당이 첨가되지 않은 배지 (당-기아배지, sucrose starvation medium)가 사용된다. 담배의 경우 0.4 M mannitol 용액을 사용하여 30°C에서 3일간 전처리한 후 배양배지로 옮기면 배가 유기된다 (Kyo and Harada 1985). 그러나 이와같이 심한 기아배지 보다는 0.4 M mannitol 용액에 여러 종류의 무기물이 첨가된 당-기아배지 B (Kyo and Harada 1986)가 담배 (Touraev et al. 1996a,c)를 비롯하여, 보리 (Hoekstra et al. 1992), 밀 (Li and Devaux et al. 2001; Touraev et al. 1996b), 벼 (Raina and Irfan 1998), 사과 (Höfer et al. 1999) 등 많은 식물들에서 이용되고 있다. 보리에서는 당-기아배지 B 뿐만 아니라 이와 유사한 조성의 배지들이 사용되기도 한다 (Hoekstra et al. 1997; van Bergen et al. 1999; Wang et al. 1999).

전처리 배지의 조성은 소포자 배의 유기뿐만 아니라 배의 발달과 유식물체 생산에도 크게 영향을 미치는데 지나친 기아배지 보다는 무기양분이 포함된 배지가 배의 발달에 효과적이다 (Li and Devaux 2001; Liu et al. 2002). 보리의 소포자 배양 시 0.3 M mannitol 용액, 0.3 M mannitol 용액에 10 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 배지, 그리고 수종의 무기물이 포함된 당-기아배지 B를 이용하여 전처리하는 경우 당-기아배지 B를 사용하였을 때 배의 발생과 발달이 좋다 (Li and Devaux 2001). 밀의 경우에도 0.4 M mannitol 용액, FHG (Kasha et al. 1990) 배지의 macronutrients 용액, 및 0.4 M mannitol 용액에 FHG의 macronutrients를 첨가한 배지에 전처리하면 0.4 M mannitol 용액에 macronutrients가 첨가된 배지를 사용하였을 때에만 배나 캘러스가 발생하며 이외의 전처리 배지를 사용하는 경우에는 수회 분열만 일어 날뿐 배로 발달하지 못 한다 (Hu et al. 1995). 뿐만 아니라 밀의 소포자 배양 시에는 전처리 배지에 배양 배지를 10% 첨가하는 경우 배의 발달 정도가 증가되어 재분화된 녹색식물체의 비율이 크게 증가한다 (Liu et al. 2002).

유채의 소포자 배양 시 toxic한 물질이 발생하는데 이 독소는 소포자 자체에서 발생하기 때문에 자가독소 (autotoxin)라고 한다 (Kott et al. 1988). 배지로 방출된 이 독소는 배의 발생을 억제하는데 배양 후 새 배지를 첨가하거나 사용한 배지를 새 배지로 교환하면 배의 발생이 증가한다. 유채의 경우 배양 14일 후 새 배지를 첨

가하면 배의 발생이 4배 증가하고 배의 질 또한 향상된다 (Ferrie and Keller 2007). 한편 순무 (*Brassica napus* ssp. *rapifera*)의 경우 ‘Stenhaus’ 품종을 사용한 소포자 배양 시 배양 3일 후 새 배지로 교환하면 배의 발생은 8배 이상, 자엽배의 발생은 3배 이상 높아진다 (Hansen and Svinnsset 1993). 배양용기의 크기와 재질, 또는 뚜껑을 닫은 후의 밀봉 재료들도 소포자배의 발생과 발달에 영향을 미치는데 호밀 (*Secale cereale* L.)의 약배양 시 직경이 3.4 cm와 5.4 cm인 배양 접시를 사용한 경우 5.4 cm 크기의 것을 사용하였을 때 캘러스의 생장이 좋고 녹색식물체 생산비율도 4배 이상 증가한다 (Immonen and Anttila 2000).

이상에서와 같이 소포자 배양 시 배의 발생은 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있는데 고추에서는 최근 본 연구자들이 소포자 배양에 의해 비교적 많은 수의 배를 획득하는데 성공하였으나 이와 같은 요인들이 배의 발생에 미치는 영향을 밝힌 연구는 이루어지지 않았다 (Kim et al. 2008; Lee et al. 2007; Park et al. 2005). 따라서 본 연구에서는 고추의 소포자 배양 시 배의 발생 및 발달에 적합한 전처리 및 배양 조건을 밝히기 위해 소포자의 나출 및 전처리 시 사용되는 배지의 sucrose 농도, 전처리 시 배양배지의 첨가, 배양 중 새 배지의 첨가, 및 배양 용기의 크기가 배의 발생과 발달에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

고추 (*Capsicum annum* L.)의 밀양재래 품종을 사용하였으며, 모식물의 생육, 꽃봉오리의 수확 및 멸균은 선행연구 (Kim et al. 2008)에서와 동일하였다. 즉 모식물이 생육된 생장실의 온도는 25/20°C (명/암), 광주기는 16/8 h (명/암), 광도는 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 였다. 꽃봉오리는 2/4-3/4이 보라색으로 착색된 약이 들어있는 것들을 채취하여 2% sodium hypochlorite 용액으로 10분간 멸균하였다.

### 소포자의 나출 및 수확

꽃봉오리로부터의 소포자의 나출, 체세포 조직과 소포자의 분리, 및 소포자의 수확과 수세는 Park 등 (2005)의 방법에 따랐다. 즉 소포자 전처리 시에는 멸균된 30개의 꽃봉오리를 blender cup에 넣고 전처리 배지 10 ml를 첨가하여 blending (16,000-18,000 rpm)하고, 이를 다시 vortexing하여 약 내 소포자를 나출 하였다. 구멍의 크기가 75  $\mu\text{m}$ 와 35  $\mu\text{m}$ 인 채를 이용해 크기가 큰 체세포 조직 파편들을 제거한 후 1,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 소포자를 수확하였으며 동일한 방법으로 3회 멸균수로 수세하였다. 약전처리 시에는 전처리한 약을 모아 blender cup에 넣고 전처리 배지 4 ml를 첨가한 후 10초씩 2회 blending 하였으며 이후 소포자의 수확 및 수세는 소포자 전처리 시와 동일하게 하였다. 소포자 나출 시의 배지는 전처리 시와 동일한 조성의 배지인 당-기아배지 A를 사용

하였다 (전처리 참조).

단 소포자의 나출 시 sucrose 농도의 영향을 조사한 실험에서는 10% 또는 13% sucrose가 첨가된 NLNS 배지 (Kim et al. 2008)를 사용하였다.

### 전처리

소포자나 약을  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3일간 고온처리 하였다. 전처리 배지 내 sucrose 농도와 배양 용기의 영향을 조사하기 위한 실험에서는 소포자 전처리를 하였으며 이외의 실험에서는 약전처리를 하였다. 소포자 전처리는 나출한 소포자의 밀도가 1 ml에  $19\text{--}21 \times 10^4$ 이 되도록 조정하여  $9.0 \times 2.0$  cm 배양접시에 8 ml 씩 분주하였고, 약전처리는 30개의 꽃봉오리로부터 꺼낸 150–180개의 약을 멸균하여 액체 상태의 전처리 배지 3 ml이 들어있는  $6.0 \times 1.5$  cm 배양접시에 50–60개 씩 치상하였다. 전처리 시 배지는 Wang et al. (1999)이 보리의 약 전처리 시 사용하였던 것과 동일한 조성의 것, 즉 0.37 M mannitol, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{KNO}_3$ , 200 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 M KI, 그리고 100 nM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 가 포함된 것을 pH 5.8로 조정하여 사용하였다 (당-기아배지 A라 칭함).

단 전처리 배지 내 sucrose 농도가 소포자배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 10%와 17% sucrose가 첨가된 NLNS 배지를 사용하였으며, 전처리 배지 내 배양배지의 첨가가 소포자배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 당-기아배지 A와 0.37 M mannitol 용액에 NLNS 배양배지가 각각 0, 5, 10, 20, 및 40% 첨가된 배지를 사용하였다.

### 소포자 배양

소포자 배양 시 배지는 Swanson (1990) 이 유체의 소포자 배양에 사용하였던 배지에서 성장조절제를 제거하고 KI 0.83 mg/L와 10% sucrose를 첨가한 배지인 NLNS 배지(Kim et al. 2008)를 사용하였으며, 소포자의 밀도는 1 ml에 약  $10 \times 10^4$ 이 되도록 조정하였다.  $6.0 \times 1.5$  cm 배양접시에 2.5 ml씩 치상하여  $27^\circ\text{C}$ , 암 상태에서 배양하였다.

단 전처리 배지 내 sucrose 농도가 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는  $3.0 \times 1.0$  cm 배양접시에 1 ml씩 치상하였으며, 배양용기의 크기가 배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는  $3.5 \times 1.0$  cm와  $6.0 \times 1.5$  cm 배양접시에 각각 1 ml 과 2.5 ml씩 치상하였다.

배양 중 새 배지의 첨가가 소포자배의 발생에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 배양 2주와 3주 후에 새 배지를 10% (0.25 ml/배양접시) 또는 20% (0.5 ml/배양접시) 첨가하였다.

### 소포자의 활력조사

소포자의 활력은 Heslop-harrison (1970)의 방법에 따라 조사하였

다. 즉 fluorescein diacetate (FDA) 2 mg을 1 ml의 acetone에 녹여 stock solution을 만들어 보관한 후 사용 직전에 stock solution 3  $\mu\text{l}$ 를 1 ml의 증류수에 희석한 working solution을 만들어 사용하였다. 전처리한 소포자를 FDA working solution에서 10분 동안 반응 시킨 후 B 또는 IB Filter를 사용하여 형광현미경 하에서 관찰하였다.

### 결과조사

실험은 1개의 배양접시를 1반복으로 하여 한 처리에 5–7 반복 씩 3회 이상 실시하였다. 배양 4주 후 해부 현미경 10배의 배율 하에서 1개의 배양접시에서 발생한 배의 수를 계수하여 평균과 표준 오차를 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 소포자의 나출 및 전처리 배지 내 sucrose 농도가 배의 발생에 미치는 영향

소포자의 나출 및 전처리 시 사용되는 배지 내 sucrose의 농도가 배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 나출 시에는 10%와 13% sucrose가 첨가된 NLNS 배지를, 전처리 시에는 10%와 17% sucrose가 첨가된 NLNS 배지를 사용하여 소포자를 나출 및 고온처리한 후 10% sucrose가 첨가된 NLNS 배지에 배양하였으며 4주후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 발생한 배의 전체 수는 소포자 나출 시 10% sucrose가 첨가된 배지를 사용한 경우 전처리 배지 내 sucrose 농도가 10%와 17% 일 때 각각 8.3, 7.0개로 10% 첨가 시 높았다. 나출시 13% sucrose가 첨가된 배지를 사용한 경우에도 발생한 배의 전체 수는 전처리 배지 내 sucrose 농도가 10%인 경우 8.5개로 17% 인 경우의 6.0개에 비해 많았다 (Table 1).

발생한 배의 발달을 조사한 결과 소포자 나출 시 10% sucrose가 첨가된 배지를 사용한 경우 구형이나 심장형 배만 발생하였으며 자엽배가 발생하지 않았으나 13% sucrose가 첨가된 배지를 사용한 경우에는 구형과 심장형배 뿐만 아니라 자엽배도 발생하였다. 자엽배의 발생은 전처리 배지 내 sucrose 농도에 따라 차이가 나서 17% sucrose가 첨가된 경우에 1.0개인 것에 비해 10% sucrose가 첨가된 경우에는 1.5개로 더 많았다 (Table 1).

유체의 경우 전처리 배지를 따로 사용하지 않고 10% sucrose가 첨가된 NLN 배지에 치상하여  $32^\circ\text{C}$ 에서 수일간 고온처리 한 후  $25^\circ\text{C}$ 에 옮겨 배양하면 용이하게 배가 발생한다 (Swanson 1990). 그러나 전처리 시 sucrose의 농도를 높여 17% sucrose가 첨가된 NLN 배지에서 고온처리 한 후 10% sucrose가 첨가된 NLN 배지에 옮겨 배양하면 *B. campestris*의 경우 배의 발생이 1.4–6.9배 증가하며 (Baillie et al. 1992), *B. juncea*의 경우에는 9배나 증가한다 (Lionneton et al. 2001). 뿐만 아니라 *B. rapa*에서 'parkland' 품종을 사용하여 72시간 고온 처리하는 경우 10% sucrose가 첨가된 NLN 배지에 치상하여 고온처리 한 후  $25^\circ\text{C}$ 에 옮겨 배양하면 배가 발생하지 않

**Table 1** Influence of sucrose concentration in the isolation and pretreatment media on the production of embryos in isolated microspore cultures of hot pepper (*C. annuum* L.)

% of sucrose		No. of embryos/plate <sup>a</sup>			
Isolation medium	Pretreatment medium	Globular & Heart	Cotyledonary	ELS <sup>b</sup>	Total
10	10	8.3±3.2	0	0	8.3±3.2
	17	7.0±1.1	0	0	7.0±1.1
13	10	5.0±1.2	1.5±0.7	2.0±1.4	8.5±0.7
	17	5.0±1.3	1.0±0.4	0	6.0±2.8

<sup>a</sup>Values are the means of three independent experiments ± SE (n=5). Every 3.5×1.0 cm plate contained 100,000 microspores.

<sup>b</sup>ELS indicates embryo-like structure.

**Table 2** Influence of culture medium addition to the pretreatment medium on the production of embryos in isolated microspore cultures of hot pepper (*C. annuum* L.)

Pretreatment medium	% of culture medium	No. of embryos/disha			
		Globular & Heart	Cotyledonary	ELS <sup>b</sup>	Total
A	0	30.5±8.9	0	24.9±7.8	55.4±14.1
	5	3.9±3.2	0.6±0.4	16.0±4.4	20.4±6.4
	10	0.7±0.5	2.1±1.6	13.1±1.7	15.8±3.2
	20	1.2±1.0	1.1±1.0	10.3±2.3	12.6±3.3
	40	0.4±0.3	0	11.8±3.1	12.2±3.0
0.37 M mannitol	0	5.4±3.0	0.4±0.3	5.4±3.4	11.2±5.9
	5	0.2±0.1	0	2.8±1.4	3.0±1.5
	10	0	0.5±0.2	1.0±0.8	1.5±0.6
	20	0	0	2.4±1.9	2.4±1.9
	40	0.3±0.2	0	2.8±0.8	3.1±1.0

<sup>a</sup>Values are the means of three independent experiments ± SE (n=5). Every 6.0×1.5 cm plate contained 250,000 microspores.

<sup>b</sup>ELS indicates embryo-like structure.

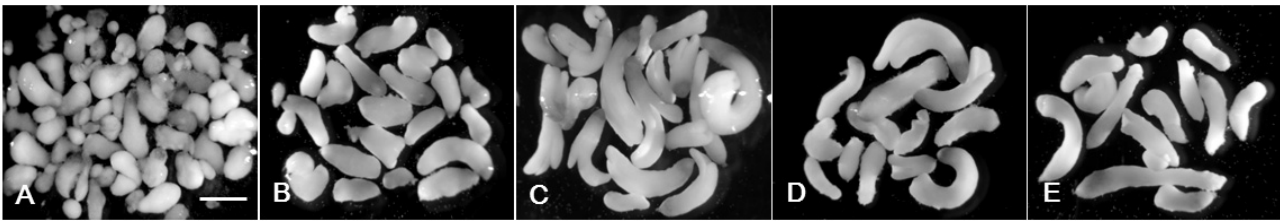
나 17% sucrose가 첨가된 NLN 배지에서 고온처리 한 후 10% sucrose가 첨가된 NLN 배지에 옮겨 배양하면 배가 발생한다 (Ferrie et al. 1995). 이와 같이 Brassica 속 식물들에서는 전처리 시 sucrose 농도가 높은 것이 배의 발생에 효과적인 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구에서 sucrose 농도를 10%와 17%로 달리하여 첨가한 NLNS 배지에서 전처리한 후 10% sucrose가 첨가된 NLNS 배지에 옮겨 배양한 결과 17% 첨가된 배지에서 전처리하였을 때 배의 발생이 오히려 감소하였다. 따라서 17% sucrose가 첨가된 배지에서 전처리한 경우 배의 발생이 증가되었다는 *B. campestris* (Baillie et al. 1992), *B. juncea* (Lionneton et al. 2001), 및 *B. rapa* (Ferrie et al. 1995)에서와는 달리 고추에서는 전처리 배지의 sucrose 농도는 배양배지의 sucrose 농도와 동일하게 하는 것이 배의 발생에 효과적인 것으로 생각된다.

전처리 배지 내 배양배지의 첨가가 소포자배의 발생에 미치는 영향

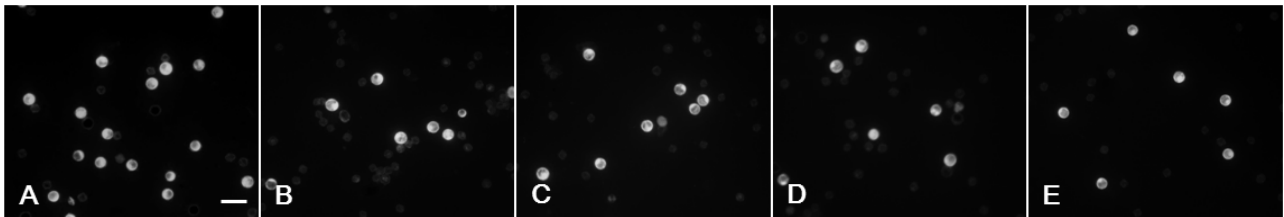
당-기아배지 A와 0.37 M mannitol 용액을 사용한 약 전처리 시 배양배지의 첨가가 소포자배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 NLNS 배양배지를 각각 0, 5, 10, 20, 및 40% 첨가하여 고온처리 한 후 배양 4주후에 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 발생한 배의

전체 수는 당-기아배지 A를 사용한 경우 배양배지를 첨가하지 않았을 때는 55.5개 이었으나 배양배지를 첨가한 경우에는 12.2–20.4개로 1/2 이하로 크게 감소하였으며 그 정도는 첨가 배지의 양이 많을수록 컸다. 0.37 M mannitol 용액을 사용한 경우에도 발생한 배의 전체 수는 배양배지를 첨가하지 않은 경우 11.2개이었으나 첨가한 경우에는 1.5–3.1개로 1/4 이하로 크게 감소하였다 (Table 2). 따라서 전처리 배지로 당-기아배지 A와 0.37 M mannitol 용액을 사용하는 경우 모두 배양배지의 첨가는 배의 발생을 억제하는 것으로 나타났다.

발생한 배의 발달을 보면 당-기아배지 A를 사용한 경우 배양배지를 첨가하지 않았을 때는 크기가 작은 구형배, 심장형배, 또는 두 개 이상의 구형배가 붙어있는 ELS가 대부분이었으며 자엽배가 발생하지 않았다. 이에 비해 배양배지를 첨가하였을 때는 배의 길이가 긴 ELS가 대부분이었고 자엽배도 발생하였다. 자엽배는 배양배지를 5%, 10%, 그리고 20% 첨가 시 발생하였는데 그 수는 각각 0.6, 2.1, 및 1.1개로 10% 첨가 시 다소 많았다 (Table 2). 0.37 M mannitol 용액 사용 시에도 배양배지를 첨가하지 않았을 때 발생한 배는 크기가 작은 구형배와 ELS가 대부분이었으며, 배양배지를 첨가하였을 때 발생한 배는 비교적 크기가 컸으며 비대한 ELS가 많았다. 그러나 자엽배는 배양배지를 첨가하지 않은 경우에도 발생



**Figure 1.** Embryos developed from microspores after 4 weeks of culture. Anthers were pretreated with starvation A medium which contained culture medium at different percentages (v/v). (A) 0%, (B) 5%, (C) 10%, (D) 20%, (E) 40 %. Bar (1 mm) in (A) applies to all the figures



**Figure 2.** FDA test for microspores after heat shock treatment (32±1°C). Anthers were pretreated with starvation A medium which contained culture medium at different percentages (v/v). (A) 0%, (B) 5%, (C) 10%, (D) 20%, (E) 40%. Bar (10 µm) in (A) applies to all the figures

**Table 3** Microspore viability after heat shock treatment in the pretreatment medium which contained culture medium at different concentrations

Pretreatment medium	% of culture medium	% of viable microspore
A	0	33.0±4.8
	5	17.1±3.0
	10	13.0±1.4
	20	13.1±11.4
	40	13.4±12.0
0.37 M mannitol	0	21.6±2.4
	5	22.2±4.3
	10	20.4±2.7
	20	24.6±3.3
	40	21.5±3.3

Data were based on the observations of 200-300 microspore for each replicate with three replicates for each treatment.

하였으며 (0.4개), 10% 첨가한 경우에도 이와 유사한 정도로 발생하였다 (0.5개). 즉 자엽배의 발생이 당-기아배지 A 사용 시 배양배지를 10% 첨가한 배지에서 다소 높았던 것과는 달리 0.37 M mannitol 용액 사용 시에는 그 차이가 거의 없었다 (Table 2, Figure 1).

당-기아배지 A에 배양배지를 첨가하여 고온처리한 후 소포자 활력을 조사한 결과 배양배지를 첨가하지 않은 경우 활력 있는 소포자의 비율은 33.0%이었으나 배양배지를 첨가한 경우에는 13.0-17.1%로 크게 감소하였다 (Table 3, Figure 2). 그러나 0.37 M mannitol 용액 사용 시 활력 있는 소포자의 비율은 배양배지를 첨가하지 않은 경우 21.6% 이었으며 배양배지를 첨가한 경우에도 20.4-24.6%로 큰 차이가 없었다.

소포자 배양 시 사용되는 전처리 배지는 크게 sucrose가 포함된

것과 포함되지 않은 것으로 구분할 수 있는데 *B. napus* (Dunwell and Thurling 1985), *B. campestris* (Baillie et al. 1992), *B. oleracea* (Ferrie et al. 1999), *B. juncea* (Lionneton et al. 2001), *B. rapa* (Ferrie et al. 1995)와 같은 Brassica 속 식물들에서는 sucrose가 포함된 NLN 배지가 사용되고 있으며, 담배, 밀, 말뱅이나물 등의 식물들에서는 sucrose가 포함되지 않은 당-기아배지가 사용되고 있다 (Hoekstra et al. 1997; Hu et al. 1995; Kernan and Ferrie 2006; Kyo and Harada 1985). 본 연구에서 전처리 배지로 sucrose가 17% 또는 10% 포함된 NLNS배지를 사용한 경우 당-기아배지 A를 사용한 경우에 비해 배의 발생이 크게 감소하였다 (Table 1, Table 2). 따라서 고추의 경우에는 담배, 밀, 보리 등에서와 같이 당-기아배지가 배의 발생에 효과적인 것으로 생각된다.

당-기아배지도 그 조성이 매우 다양하며 배의 발생은 그 조성에 따라 크게 영향을 받는데 보리의 경우 0.3 M mannitol 용액, 0.3 M mannitol 용액에 10 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 배지, 및 당-기아배지 B에 4일 동안 전처리한 결과 당-기아배지 B를 사용한 경우 분열 소포자의 비율이 2배 증가하였고, 배와 녹색식물체 발생 비율도 2배 이상 높았다 (Li and Devaux 2001). 또 밀의 소포자 배양 시에도 전처리 배지로 0.4 M mannitol 용액, FHG (Kasha et al. 1990)배지의 macronutrients용액, 그리고 0.4 M mannitol 용액에 FHG의 macronutrients를 첨가한 것을 사용한 결과 0.4 M mannitol 용액에 FHG의 macronutrients를 첨가한 배지를 사용한 경우에만 캘러스가 발생하였다 (Hu et al. 1995). 이와 같은 결과들은 소포자 배의 발생에 효과적인 전처리 배지는 지나치게 심한 기아배지 보다는 무기양분이 포함된 배지임을 의미한다. 본 연구에서도 0.37 M mannitol 용액과 당-기아배지 A를 사용하여 전처리한 결과 0.37 M mannitol 용액 사용 시에 비해 0.37 M mannitol 용액에 수종의 무기양분이 포함된 당-기아배지 A 사용 시에 배의 발생이 크게 증가하였다. 따라서 고

추의 소포자 배양 시에도 배의 발생에 효과적인 전처리 배지는 밀과 보리에서와 같이 삼투압만 조절되는 심한 기아배지 보다는 무기양분이 포함된 당-기아배지 A인 것으로 밝혀졌는데 이와 같은 결과는 당-기아배지에서의 고온처리 결과 embryogenic하게 된 소포자가 배로 발달하는데 필요한 양분이 전처리 시에 공급될 수 있었기 때문인 것으로 생각된다.

전처리 시 사용되는 배지는 배의 발생 뿐만 아니라 발달에도 영향을 미치는데 밀의 경우 전처리 배지에 배양배지를 첨가하면 배의 발생은 감소하지 않으면서 배의 질이 좋아져서 녹색 식물체의 발생 비율이 증가한다 (Liu et al. 2002). 본 연구에서 전처리 배지 내 배양배지의 첨가가 배의 발생과 발달에 미치는 영향을 조사하기 위해 10% sucrose가 포함된 NLNS 배양 배지를 당-기아배지 A와 0.37 M mannitol 용액에 5-40% 첨가하여 전처리한 결과 배의 발달 정도는 다소 증가하였으나 발생한 배의 전체 수는 크게 감소하였다. 따라서 고추의 소포자 배양 시에는 밀의 경우에서와는 달리 배양배지가 첨가된 전처리 배지의 사용은 배의 발생을 크게 억제하므로 효과가 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 전처리 시 sucrose가 첨가된 배지를 사용하는 경우 배의 발생이 크게 감소하였던 이전의 결과로 (Kim et al. 2009) 미루어 보아 배양배지 내에 포함되어 있었던 sucrose가 전처리 배지에 첨가되어 배의 발생을 억제하였기 때문인 것으로 생각된다.

배양 중 새 배지의 첨가가 배의 발생에 미치는 영향

배양 중 새 배지의 첨가가 배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 배양 2주와 3주후에 새 배지를 10% 또는 20% 첨가하여 4주 후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 발생한 배의 전체 수는 새 배지를 첨가하지 않은 경우 58.2개였으나 첨가 시에는 48.3-56.8개로 다소 감소하였다. 배양 2주후에 첨가하는 경우 발생한 배의 수는 10% 첨가 시 56.8개, 20% 첨가 시에는 55.0개로 10% 첨가 시 다소 높았으며, 배양 3주후 첨가 하는 경우에도 10% 첨가 시에는 54.9개, 20% 첨가 시에는 48.3개로 2주후 첨가 시에서와 같이 10% 첨가 시에 높았다 (Table 4).

발생한 배의 발달을 조사한 결과 새 배지를 첨가하지 않은 경우

와 첨가한 경우 모두 구형배와 ELS가 대부분이었으며 배의 크기가 작았다. 자엽배의 발생도 새 배지를 첨가하지 않은 경우 0.3개 이었으며, 첨가한 경우에도 0.3-0.4개로 배지 첨가에 따른 변화가 없었다. 따라서 배양 중 새 배지의 첨가는 배의 발달에도 효과가 없었다.

소포자를 배양한 후의 배지 내에는 자가독소가 함유되어 있으며 이로 인해 소포자 배의 발생이 저하될 뿐만 아니라 배의 발달에도 영향을 미쳐 생장이 멈추게 되거나 비정상인 배가 생기게 된다 (Kott et al. 1988). 이를 극복하기위해 배양 후 사용한 배지를 새 배지로 교환하거나 또는 새 배지를 첨가한다. 유채에서는 배양 1일 후 사용한 배지를 새 배지로 교환하면 자엽배의 발생이 약 2배정도 증가하며 (Kott et al. 1988), 순무의 경우에도 배양 3일 후 새 배지로 교환하면 품종에 따라 차이는 있으나 배의 발생이 2-8배 이상, 자엽배의 발생은 최대 3배 이상 증가한다 (Hansen and Svinnet 1993). 한편 옥수수의 소포자 배양 시에는 새 배지로 교환하는 대신 배양 18일 후 기존의 배지에 새 배지를 첨가하여 배양하며 (Nägeli et al. 1999), 유채의 소포자 배양 시에도 배양 12일 후 새 배지를 첨가한 후 진탕하면서 배양하면 75% 이상의 배가 정상 어뢰형 배로 발달한다 (Swanson et al. 1987). 본 연구에서도 배양 2, 3주 후에 새 배지를 첨가하는 실험을 수행 하였으나 배의 발생이나 발생한 배의 발달 모두 큰 변화가 없었다. 이와 같은 결과에 대한 원인으로 여러 가지를 고려 할 수 있으나 새 배지의 첨가시기에 따라서 배의 발생이 달라질 것으로 생각된다. 실제로 유채의 경우 배양 직후부터 비발생적 소포자 (non-embryogenic microspore)에서 자가독소가 생성되어 배지로 방출되며 독소의 제거 시기가 늦을수록 배의 발생이 감소하는데 배양 1일 후 사용한 배지를 새 배지로 교환하면 배의 발생과 발달이 크게 증가한다 (Kott et al. 1988). 따라서 고추의 소포자 배양 시 새 배지를 첨가하는 경우 좀 더 빠른 시기에 하는 것이 배의 발생과 발달에 효과적일 것으로 생각된다.

배양용기의 크기가 배의 발생에 미치는 영향

배양 용기가 배의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 배양 배지 내 소포자 밀도가 약  $10 \times 10^4$ /ml이 되도록 조정된 후 크기가

**Table 4** Influence of the addition of medium during culture on the production of embryos in isolated microspore cultures of hot pepper (*C. annuum* L.)

Time after culture (wk)	Vol. of medium added (%)	No. of embryos/plate <sup>a</sup>			
		Globular & Heart	Cotyledonary	ELS <sup>b</sup>	Total
0 (control)	0	33.2±3.1	0.3±0.2	24.8±7.0	58.2±6.1
2	10	33.8±5.9	0.4±0.3	22.6±9.0	56.8±8.1
	20	33.7±10.7	0.3±0.1	21.0±10.6	55.0±14.4
3	10	30.8±5.5	0.3±0.1	23.9±6.0	54.9±5.9
	20	27.5±4.7	0.4±0.3	20.8±6.4	48.3±8.1

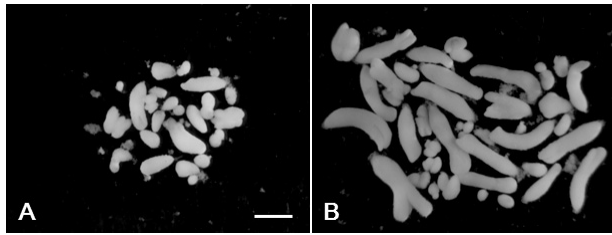
<sup>a</sup>Values are the means of three independent experiments ±SE (n=4). Every 3.5x1.0 cm plate contained 100,000 microspores.

<sup>b</sup>ELS indicates embryo-like structure.

**Table 5** Influence of culture plate size on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper (*C. annuum* L.)

Plate size (cm)	No. of embryos/plate <sup>a</sup>			
	Globular & Heart	Cotyledonary	ELS <sup>b</sup>	Total
3.5x1.0	11.5±3.6	0.9±0.4	6.9±3.7	19.2±7.7
6.0x1.5	25.4±5.6	6.8±1.7	16.6±5.1	48.7±12.4

<sup>a</sup>Values are the means of three independent experiments ±SE (n=5). <sup>b</sup>ELS indicates embryo-like structure.



**Figure 3.** Embryos developed from microspores after 4 weeks of culture. Microspores were cultured in plates which are different in size. (A) 3.5×1.0 cm, (B) 6.0×1.5 cm. Bar (1 mm) in (A) also applied to (B)

3.5×1.0 cm와 6.0×1.5 cm인 용기에 각각 1 ml 과 2.5 ml 씩 분주하여 4주 후에 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 한 개의 용기에서 발생한 배의 전체 수는 3.5×1.0 cm 크기의 것을 사용한 경우 19.2개 이었으나, 6.0×1.5 cm 크기의 것을 사용한 경우에는 48.7개로 약 2.5배 많았다. 그러나 3.5×1.0 cm와 6.0×1.5 cm인 용기에 각각 1 ml 과 2.5 ml 씩 분주하였으므로 치상한 소포자 수에 따른 비율로 볼 때 배의 발생에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

한편 배의 발달을 조사한 결과 3.5×1.0 cm 용기를 사용한 경우 발생한 배의 대부분이 크기가 작은 구형배와 배축만 발달된 ELS 이었으나, 6.0×1.5 cm 용기를 사용한 경우에는 구형배, 심장형배 뿐만 아니라 길이가 긴 ELS가 많았다. 또 자엽배의 발생은 3.5×1.0 cm 용기에서는 0.9개뿐이었으나 6.0×1.5 cm 용기에서는 6.8개로 7 배 이상 많았다 (Table 5, Figure 3). 따라서 발생한 배의 발달에는 크기가 큰 6.0×1.5 cm 용기를 사용하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

소포자배의 발생은 배양기 내의 공기 상태에 따라 크게 영향을 받는데 양배추 (*Brussel sprouts*)의 약배양 시 35℃에서 6시간 고온 처리한 후 배양기 내의 공기를 분석해보면 약배양에 대한 반응이 낮은 품종은 높은 품종에 비해 에틸렌 생성이 10-20배나 높으며 에틸렌 전구체인 1-aminoocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)나 에틸렌 발생물질인 ethephon을 배지에 첨가하면 소포자배의 생산이 억제된다 (Biddington and Robinson 1991). 또 담배의 약배양시에도 에틸렌 가스가 발생하는데 배양기내의 에틸렌 가스를 제거하면 배의 발생이 증가하며 발생한 배의 발달도 향상된다 (Dunwell 1979). 따라서 소포자배의 발생은 배양용기의 크기에 따라서도 영향을 받을 것으로 생각된다. 실제로 호밀의 경우 직경이 3.4 cm인 것과 5.4 cm인 배양접시를 사용하여 약을 배양 하면 크기가 큰 5.4 cm인 배양접시를 사용하였을 때 캘러스로부터의 녹색 식물체 발생 비율이

5.4배 이상 높다 (Immonen and Anttila 2000). 본 연구에서도 크기가 3.5×1.0 cm와 6.0×1.5 cm로 각기 다른 용기에 소포자를 배양한 결과 6.0×1.5 cm 용기사용 시 자엽배의 발생이 7배 이상 많았다. 따라서 호밀의 경우에서와 같이 소포자 배양에 적합한 배양 용기는 크기가 큰 6.0×1.5 cm 인 것으로 나타났는데 이와 같은 결과는 용기 내 공간이 넓어 공기의 순환이 비교적 원활하게 이루어졌기 때문인 것으로 생각된다.

## 사 사

이 논문은 2007년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (R01-2005-000-10338-0)

## 적 요

고추의 소포자 배양 시 전처리 배지, 배양 후 새 배지의 첨가, 및 배양 용기의 크기가 배의 발생 및 발달에 미치는 영향을 조사하였다. 고온 전처리 (32±1℃) 시 사용된 배지 중 배의 생산에 적합한 것은 당-기아배지 A이었으며, 0.37 M mannitol 용액이나 sucrose가 첨가된 NLNS배지는 배의 생산에 비효율적이었다. 전처리 배지인 당-기아배지 A와 0.37 M mannitol 용액에 배양배지를 첨가하는 경우 배의 발달 정도는 증가하였으나 배의 생산은 크게 감소하였다. 배양 2, 3 주 후의 새 배지 첨가는 배의 생산에 효과가 없었다. 배양용기는 3.5×1.0 cm 크기의 것 보다는 6.0×1.5 cm 크기의 것을 사용하는 것이 배의 발달에 효과적이었다. 이상에서와 같은 결과들은 고추에서 다수의 배를 생산할 수 있는 소포자 배양시스템을 확립하는데 중요한 기초자료가 될 것이다.

## 인용문헌

- 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
- Biddington NL, Robinson HT (1991). Ethylene production during anther culture of Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) and its relationship with factors that affect embryo production. Plant Cell Tissue Organ Cult 25:169-177
- Buyukalaca S, Comlekcioglu N, Abak K, Ekbic E, Kilic N (2004) Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos

- via anther culture. *Eur J Hort Sci* 69(5):206-209
- Castillo AM, Cistue L, Vallés, Sanz JM, Romagosa I, Molina-Cano JL (2001) Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. *Plant Cell Rep* 20:105-111
- Dunwell JM (1979) Anther culture in *Nicotiana tabacum*. The role of the culture vessel atmosphere in pollen embryo induction and growth. *J Exp Bot* 30:419-428
- Dunwell JM, Thurling N (1985) Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *J Exp Bot* 36:1478-1491
- Ferrie AMR, Epp DJ, Keller WA (1995) Evaluation of *Brassica napus* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. *Plant Cell Rep* 14:580-584
- Ferrie AMA, Keller WA (2007) Optimization of methods for using polyethylene glycol as a non-permeating osmoticum for the induction of microspore embryogenesis in the *Brassicaceae*. *In Vitro Cell Dev Biol* 43:348-355
- Hansen M, Svinset K (1993) Microspore culture of swede (*Brassica napus* ssp. *rapifera*) and the effects of fresh and conditioned media. *Plant Cell Reports* 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
- Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv Igri. *Plant Sci* 86:89-96
- Hoekstra S, van Bergen S, van Brouwershaven IR, Schilperoord RA, Wang M (1997) Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. *Plant Sci* 126:211-218
- Hoekstra S, van Zijderveld, MH Louwerse, JD, Heidekamp, F, van der Mark F. (1992) Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv Igri. *Plant Sci*. 86:89-96
- 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 estivum* L.) in a defined media I. effects of pretreatment, isolation methods, and hormones. *In Vitro Cell Dev Biol* 31:79-83
- Immonen S, Anttila H (2000) Media composition and anther plating for production of androgenetic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.). *J Plant Physiol* 156:204-210
- Jähne A, Becker D, Bretschneider R, Lörz H (1994) Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theor Appl Genet* 89:525-533
- Jähne A, Lörz H (1995) Cereal microspore culture. *Plant Sci* 109: 1-12
- Kasha KJ, Ziauddin A, Cho UH (1990) Haploids in creal improvement: anther and microspore culture. In: Gustafson JP ed. Gene manipulation in plant improvement II. Plenum, New York, pp 213-235
- Kernan Z, Ferrie AM (2006) Microspore embryogenesis and the development of a double haploidy protocol for cow cockle (*Saponaria vaccaria*). *Plant Cell Rep* 25:274-28
- Kim M, Jang IC, Kim JA, Park EJ, Yoon M, Lee Y (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27:425-434
- Kim M, Park EJ, Lee Y (2009) Increased embryo production by manipulation of plant treatment materials and media in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). In Kumar A, eds, Recent advances in plant biotechnology. The India, pp 572-588
- Kott LS, Polsoni L, Ellis B, Beversdorf WD (1988) Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. *Can J Bot* 66:1665-1670
- Kyo M, Harada H (1985) Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. *Plant Physiol* 79:90-94
- Kyo M, Harada H (1986) Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta* 168:427-432
- Lee JS, Park EJ, Kim MZ (2007) 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 annum* L.). *Kor J Plant Biotech* 34: 363-373
- Li H, Devaux P (2001) Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep* 20:475-481
- Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol* 105:427-434
- Lionneton E, Beuret W, Delaitre C, Ochatt S, Rancillac M (2001) Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). *Plant Cell Rep* 20:126-130
- Liu W, Zheng MY, Konzak CF (2002) Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 20:821-824
- Mitykó J, Fári M (1997) Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther- and microspore culture. *Acta Hort.* 447:281-287
- Nägeli M, Schmid JE, Stamp P, Büter B (1999) Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: impact of carbohydrates, plating density and time of transfer. *Plant Cell Rep* 19:177-184
- Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J (2006) Androgenic response to preculture stress in microspore cultures of barley. *Protoplasma* 228:95-100
- Park E, Kim J, Lee J, Jang I, Yoon M, Chung 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
- 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
- Stöger E, Fink C, Pfosser M, Heberle-Bors E (1995) Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen. Plant Cell Rep 14:273-278
- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E, Custers JBM (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep 25:1-10
- Swanson EB (1990) Microspore culture in Brassica : In Pollard JW and Walker JM, eds, Methods in molecular biology, Vol. 6, Plant cell and tissue culture. Humana Press, New Jersey, pp 159-170
- Swanson EB, Coumans MP, Wu SC, Barsby TL, Beversdorf WD (1987) Efficient isolation of microspores and the production of microspore-derived embryos from Brassica napus. Plant Cell Reports 6:94-97
- Swanson EB, Herrgesell MJ, Arnoldo M, Sipell DW, Wang RSC (1989) Microspore mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to the imidazolinones. Theor Appl Genet 78: 525-531
- Testillano PS, González-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
- Testillano PS, González-Melendi P, Coronado MJ, Seguí-Simarro JM, Moreno-Risueno MA, Risueno MC (2005) Differentiating plant cells switched to proliferation remodel the functional organization of nuclear domains. Cytogenet Genome Res 109:166-174
- Touraev A, Ilham A, Vicente O, Heberle-Bors E (1996a) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. Plant Cell Rep 15:561-565
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996b) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sex Plant Reprod 9:209-215
- Touraev A, Pfosser M, Vicente O, Heberle-Bors E (1996c) Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. Planta 200:144-152
- van Bergen S, Kottenhagen MJ, van der Meulen RM, Wang M (1999) The role of abscisic acid in induction of androgenesis: A comparative study between *Hordeum vulgare* L. Cvs. Igri and Digger. J Plant Growth Regul 18:135-143
- Wang M, Hoekstra S, van Bergen S, Lamers GEM, Oppedijk BJ, van der Heijden MW, de Priester W, Schilperoort RA (1999) Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. Plant Molecular Biology 39:489-501

(접수일자 2009년 6월 23일, 수리일자 2009년 6월 27일)