

고추의 소포자 배양 시 배지 첨가와 진탕이 배의 생산에 미치는 영향

안동주 · 박은준 · 김문자

Influence of medium addition and agitation on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.)

Dongju An · Eun-Joon Park · Moonza Kim

Received: 13 January 2011 / Accepted: 7 February 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The influences of the agitation as well as the addition of medium during culture on the production of embryos were investigated in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). When the culture medium was added during initial liquid culture step of liquid-double layer culture, the embryo yield and quality greatly increased. The most effective time point for medium addition was 5 days after the culture commenced. On the other hand, the effect of medium addition at later double layer culture step in liquid-double layer culture on the embryo production was less compared to that of medium addition during the initial liquid culture step. Agitating the culture for 1 week during later double layer culture step in liquid-double layer culture effectively increased the production of normal cotyledonary embryos. In the case of liquid culture, agitating the culture for 1 week from 7 days after the culture commenced was also effective for embryo development. However, when the total agitation time was longer (2 to 3 weeks) during liquid-double layer culture or liquid culture, the embryos developed abnormally in both cases. The normal cotyledonary embryos obtained in this study successfully developed to plants when transferred to regeneration media. These regenerated plants were either diploid or haploid, and there was a difference in the number of chloroplasts between guard cells of diploid and haploid. These results can be used as an important data for developing an efficient microspore culture system with high quality embryo production in hot pepper.

Keywords Agitation culture, *Capsicum annuum* L., Haploid, Microspore culture

서론

자연 상태에서 식물은 감수 분열에 의해 염색체 수가 반으로 줄어든 소포자 또는 대포자를 만들게 되며 이들은 체세포 분열을 하여 융성배우체인 화분이나 자성배우체인 배낭을 만든다. 이후 배우체 내의 난세포와 정세포가 수정하여 본래의 염색체수와 동일한 식물체를 만들게 된다. 그러나 이러한 수정이 없이 배우자가 단독으로 배발생을 하여 염색체의 수가 반만 있는 조포체 즉 반수체로 발달하기도 하는데 이와 같은 반수체는 콜히친과 같은 방추사형성억제제를 처리하면 당대에 100% 동형 접합자로 된 배가 반수체 (double haploid)를 만들 수 있으므로 새로운 품종을 육성하는데 있어 매우 귀중한 재료가 된다. 그러나 자연 상태에서 발생하는 반수체는 그 수가 매우 적어 실제 육종에 이용하기 어려우므로 인위적으로 생산할 수 있어야 한다. 반수체를 인위적으로 생산하는 방법에는 배주 배양 (ovule culture), *Hordeum vulgare*와 *H. bulbosum*의 종간 교잡에 의해 *H. vulgare*의 반수체를 생산하는 *bulbosum technique* (Kasha and Kao 1970), 약 배양 및 소포자배양이 있으나 이중 가장 널리 이용되고 있는 것은 약배양과 소포자배양이다.

약배양이나 소포자 배양 모두 소포자나 미숙화분 유래의 반수체를 생산한다는 점에서는 같지만 소포자 배양 시에는 약배양 시와 달리 나출 소포자만을 배양하므로 약벽 조직과 같은 체세포 조직에서 배가 형성 될 염려가 없으며, 식물에 따라 차이가 있으나 약 배양 시에 비해 배의 생산이 많다. 예를 들어 유채 (Siebel and Pauls 1989)

D. J. An · E.-J. Park · M. Z. Kim (✉)
목원대학교 생명과학과
(Department of Life Sciences, Mokwon University, 800
Doan-dong Seo-gu, Daejeon 302-729, South Korea)
e-mail: kim70@mokwon.ac.kr

와 사과 (Höfer 2004)의 경우 약배양 시에 비해 10배나 많으며, 보리에서는 'Igrí' 품종을 사용하는 경우 약배양 시에 비해 100~200배나 많다 (Davies and Morton 1998). 또 소포자 배양 시에는 나출된 단세포 상태의 소포자로부터 배가 발생하므로 배 발생 기작을 발생초기부터 분자수준에서 연구하는데 매우 유리하다 (Testillano et al. 1995; Custers et al. 2001; Indrianto et al. 2001; Maraschin et al. 2005; Supena et al. 2008). 이외에도 소포자는 반수성인 동시에 단세포 상태이므로 소포자를 이용한 형질전환이나 돌연변이 유기 시 유기된 형질전환체나 돌연변이체를 당대에 고정 할 수 있을 뿐만 아니라, chimeric 상태가 아닌 solid 상태의 형질전환체와 돌연변이체를 획득할 수 있다. 이와 같은 장점들에도 불구하고 소포자 배양은 약 배양에 비해 배양방법이 비교적 까다롭고 어려우므로 비교적 용이하게 다수의 배와 식물체를 획득할 수 있는 것은 유채 (Polsoni et al. 1988), 담배 (Touraev et al. 1996), 밀 (Liu et al. 2002), 벼 (Raina and Irfan 1998) 등 소수에 불과하며 이외의 식물들에서는 비록 소포자 배양에는 성공하였으나 배의 발생 비율이 높지 못하다.

고추에서도 소포자 배양에 관한 연구가 비교적 일찍부터 이루어졌으나 대부분의 경우 다핵세포나 다세포체를 획득하였을 뿐 다수의 배와 식물체를 획득하는데 성공하지 못하였다 (Regner 1994, 1996; Testillano et al. 1995). 그러나 최근 Kim et al. (2008)이 비교적 많은 수의 배를 생산하는데 성공하였으며, 이후 배의 유기에 적합한 전처리 조건을 밝힘으로서 다수의 배를 생산할 수 있게 되었다 (Kim et al. 2010). 또 Lantos et al. (2009) 도 정상 자엽배가 아닌 양극성 시기의 배 (embryoid at bipolar stage)이지만 배와 식물체를 획득하는데 성공하여 가지과 식물 중에서는 담배와 더불어 소포자 배양이 잘되는 식물의 하나가 되었다. 이와 같이 소포자 배양에 의해 비교적 많은 수의 배를 생산할 수 있게 되었으나 배양 3~4주후 발생한 배들 중에는 발달단계가 각기 다른 배들 즉 구형배, 심장형배, 어뢰형 배 및 자엽배 등이 혼재할 뿐만 아니라 배의 발달이 정상적으로 이루어지지 못하여 생겨난 배상체들이 많으며 정상 자엽배의 비율은 매우 낮다. 배의 발달이 비동조적으로 일어나 생겨난 미성숙배나 비정상적인 배의 발달로 생겨난 배상체들은 재분화 배지로 이식 시 유식물체로 발달하기가 매우 어렵다. 그러나 소포자 배양 시스템을 실제 기초연구나 품종육성에 이용할 수 있으려면 소포자 유래의 식물체를 다수 획득 할 수 있어야 하므로 배의 발생이 많을 뿐만 아니라 발생한 배들이 정상적으로 발달하는데 필요한 배양조건을 밝힐 수 있는 연구가 매우 시급 하다.

소포자 배양 시 배의 발생과 발달은 모식물의 생육조건에 따른 생리적 상태, 소포자의 발달 시기, 소포자의 나출 방법, 전처리 조건, 소포자의 치상 밀도, 배양 조건

등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받는다 (Swanson 1990; Jähne and Lörz 1995; Touraev et al. 1997). 이 뿐만 아니라 배양 중 새 배지의 첨가와 진탕에 의해서도 크게 영향을 받는다 (Swanson et al. 1987; Polsoni et al. 1988). 대부분의 경우 전처리가 끝난 소포자들을 배지에 치상하여 3~4주간 계속 배양한 후 얻어진 배들을 재분화 배지에 옮겨 유식물체로 발달시키지만 옥수수, 보리, 유채 등과 같은 식물들에서는 배양 도중 동일한 조성의 새 배지를 첨가하여 배양하기도 하는데 이와 같이 새 배지를 첨가하는 경우 배의 발생과 발달이 크게 좋아 진다 (Swanson et al. 1987; Hoekstra et al. 1992; Nägeli et al. 1999). 한편 소포자 배양 시 대부분의 경우 온도가 일정하게 유지되는 배양기 내에 정치하여 배양하지만 보리 (Hoekstra et al. 1992), 유채 (Ferrie et al. 1995), 옥수수 (Nägeli et al. 1999) 등과 같은 식물들에서는 진탕 배양기를 사용하여 배양하기도 하는데 유채를 비롯하여 Brassica 속에 속한 몇몇 종들에서는 배양 중 진탕을 하면 배의 발생과 발달이 크게 증가한다 (Polsoni et al. 1988; Lichter 1989).

이와 같이 소포자 배양 시 배의 발생과 발달은 배양 중 새 배지의 첨가와 진탕에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있으나 고추에서는 이와 같은 연구가 매우 드물 뿐만 아니라 액체-2층 배양 (재료 및 방법 참조) 시의 배지 첨가효과를 밝힌 연구결과는 보고되어 있지 않다 (Park et al. 2009, 2010). 또 배양 중 진탕 효과를 밝힌 연구결과도 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 고추의 소포자 배양 시 다수의 정상 자엽배를 획득할 수 있는 배양시스템을 개발하는데 필요한 기초자료를 얻기 위해 액체-2층배양 시의 새 배지 첨가와 액체-2층배양과 액체 배양 시의 진탕이 배의 생산에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서는 고추 (*Capsicum annuum* L.)의 밀양재래 품종을 사용 하였다. 2003년도에 채종하여 4°C에 냉장 보관 하였던 종자를 직경 20 cm 화분에 10립 씩 파종하여 3~4주 후 본엽이 3~4매 출현 했을 때 생육정도가 비슷한 유묘들을 선발하여 직경 25 cm 화분에 정식하였으며 매주 파종하여 연중 재료 채취가 가능하도록 하였다. 흙은 시판되고 있는 원예용 상토 (부농상토)를 사용하였고 사용 전에 121°C에서 15분간 고압 멸균하였다. 정식시에는 화분 전용 복합비료로 시판되고 있는 파워스톤 (식물실험센터; 질소 10%, 인산 5%, 수용성가리 10%)을 1개의 화분에 8 g씩 섞어 사용하였다.

모식물은 광주기가 16/8 h (명/암), 온도가 25/20°C (명/암)인 생장실에서 생육시켰다. 생장실의 광도는 형광등과 메탈램프를 이용하여 화분 위에서 측정 시 $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이 되도록 유지하였고, 상대 습도는 60%가 되도록 조절하였다. 식물 생장을 위해 관수는 1~2일마다 실시하였다. 모식물은 활력이 약해지는 것을 방지하기 위해 관수 시 마다 적기가 지난 꽃봉오리를 제거하였으며, 파종 후 12주 후부터 16주까지만 사용하였다. 꽃봉오리는 꽃받침과 꽃잎의 길이가 거의 같은 것을 취하여 약의 색깔이 2/4~3/4정도가 보라색으로 착색되어 있는 것을 확인 한 후 사용하였다. 이와 같은 약내에는 배의 발생에 적기로 알려진 후기 1핵성 소포자나 초기 2핵성 화분이 내포되어 있는 것으로 알려져 있다 (Kim et al. 2004).

소포자의 나출 및 수확

꽃봉오리들은 2% sodium hypochlorite 용액에 10분간 소독한 후 멸균된 증류수로 3회 수세하였다. 멸균된 꽃봉오리 30~35개를 stainless steel재질의 micro-blender cup (Eberbach Corporation 8575, MI, USA)에 넣고 전처리 배지 (소포자 전처리 참고) 10 ml을 첨가한 후 10초씩 2회 blending (16,000~18,000 rpm)하여 소포자를 나출 시킨 후 polypropylene 재질의 50 ml centrifuge tube (Corning 430390, Mexico)에 모았다. 약 내에 남아있는 소포자를 꺼내기 위해 10 ml의 전처리 배지를 첨가하여 고속 (약 5,000 rpm)에서 15초씩 2회 vortexing 하였다. 약에서 방출된 소포자와 분쇄된 체세포 조직들이 섞여있는 이 용액들에서 구멍의 크기가 75 μm 와 35 μm 인 체를 이용해 크기가 큰 체세포 조직 파편들을 제거하였다. 이후 다시 50 ml centrifuge tube로 옮기고 전처리 배지를 첨가하여 30 ml로 맞춘 후 700 rpm에서 7분 동안 원심분리하여 소포자 pellet을 모았다. 상등액을 제거한 후 소포자 pellet에 전처리 배지 30 ml를 첨가하여 vortexing한 후 700 rpm에서 7분 동안 원심 분리하였으며, 이와 같은 수세과정을 2회 실시하였다. Micro-blender cup은 4°C에 냉장 보관되었던 것을 소포자 나출 직전에 꺼내 사용하였다.

전처리

수세가 끝난 소포자들을 밀도가 약 $20 \times 10^4/\text{ml}$ 이 되도록 hemocytometer를 사용하여 조정된 후 90×20 mm 배양접시에 7~11 ml 씩 치상하여 parafilm으로 봉하였다. 소포자 현탁액이 들어있는 배양접시는 건조되는 것을 막기 위해 멸균수로 적신 여과지가 들어있는 140×20 mm 배양 접시에 넣은 후 다시 parafilm으로 봉하였다. 이와 같이 준비된 소포자는 $31 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3일간 고온 처리 하였다. 전처리 배지는 0.37 M mannitol+NLNS (Kim et al. 2010)를 사용

하였으며 1 N NaOH를 이용하여 pH가 5.8~6.0이 되도록 조정된 후 pore size가 0.45 μm (Nalgene DS0210-4045, USA)와 0.22 μm (Nalgene DS0210-4020, USA)인 membrane 을 사용하여 여과 멸균 하였다.

소포자 배양

전처리가 끝난 후 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 10% sucrose가 첨가된 NLNS 배양배지 (Kim et al. 2008)를 첨가하여 소포자 밀도가 약 $10 \times 10^4/\text{ml}$ 이 되도록 조정된 다음 60×15 mm 배양접시에 1.5 ml씩 치상하고 1일 후 동량의 새 배지를 첨가하였다. 소포자가 들어있는 배양접시들은 일반 시중에서 시판되고 있는 polyethylene상자에 넣어 25°C의 암 상태에서 배양하였다.

배양 초기 1주간은 액체배지에서 배양하였으며 이 후에는 고체배지가 들어있는 배양접시에 옮겨 3주간 2층배양 하였다 (이후 액체-2층 배양이라 칭함). 단 진탕 효과를 조사하기 위한 실험에서는 액체-2층 배양뿐만 아니라 액체배양도 하였으며 배양은 4주간 하였다. 1주일간 액체배지에서 배양한 소포자 현탁액을 고체배지로 옮길 때는 10 ml의 피펫을 사용하였다. 2층 배양 시 하층의 고체배지는 2% sucrose와 0.4% phytigel이 첨가된 1/2NLNS를 배양 2일 전에 60×15 mm 배양 접시에 7 ml 씩 분주하여 사용하였다. 모든 배지의 pH는 1 N NaOH를 이용하여 5.8~6.0이 되도록 조정하였다. 상층 액체 배지는 pore size가 0.45와 0.22 μm 인 membrane을 사용하여 여과 멸균 하였으며 하층 고체 배지는 온도가 121°C이고, 기압이 0.1 kg/cm^2 인 상태에서 15분간 고압 멸균 하였다.

배양 중 새 배지의 첨가효과

액체-2층 배양에서 초기 액체 배양 시 새 배지의 첨가가 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 60×15 mm 배양 접시에 소포자 현탁액 1.5 ml을 치상한 1일, 3일 및 5일 후에 동량의 새 배양 배지를 첨가하였으며 새 배지 첨가 후 각각 6일, 4일 및 2일을 더 배양하여 액체 배양기간이 1주일이 되도록 하였다. 그 후 소포자 현탁액을 고체 배지가 들어있는 배양 접시로 옮겨 3주간 2층 배양 하였다.

액체-2층 배양에서 후기 2층 배양 시 새 배지의 첨가가 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험에서는 60×15 mm 배양 접시에 소포자 현탁액 1.5 ml을 치상하여 배양하였다. 배양 5일 후 동량의 새 배지를 첨가한 상태에서 2일간 더 배양하여 액체배양 기간이 1주일이 되도록

록 하였다. 2층배양을 하기 위해 1주일 간 액체배양 한 소포자 현탁액을 고체 배지가 들어있는 배양접시에 옮길 때 새 배지를 첨가하지 않거나, 또는 1 ml을 다시 첨가하여 3주간 배양 하였다.

배양 중 진탕 효과

액체-2층 배양에서 후기 2층 배양 시의 진탕 효과를 조사하기 위한 실험에서는 60×15 mm 배양 접시에 소포자 현탁액 1.5 ml 을 치상하여 배양하였으며 배양 5일 후 동량의 새 배지를 첨가한 상태에서 2일 더 배양하여 액체 배양기간이 1주일이 되도록 하였다. 액체 배양이 끝난 후 2층 배양을 하기 위해 소포자 현탁액을 고체 배지가 들어있는 배양접시에 옮길 때 새 배지를 1 ml 첨가하여 60 rpm에서 진탕 배양하였으며 진탕 기간은 1, 2 및 3주간으로 달리하였다. 1주와 2주간 진탕 배양하는 경우 각각 2주와 1주 더 정치 배양하여 2층 배지에서의 배양기간이 3주가 되도록 하였다.

액체 배양 시의 진탕효과를 조사하기 위한 실험에서는 60×15 mm 배양 접시에 소포자 현탁액 1.5 ml을 치상하여 정치배양 하였으며 5일 후 동량의 새 배지를 첨가한 상태에서 2일 더 배양하여 정치배양 기간이 1주일이 되도록 하였다. 정치배양 1주일 후 새 배지를 1 ml 첨가 하여 60 rpm에서 진탕 배양하였으며 진탕 기간은 1, 2 및 3주간으로 달리하였다. 1주와 2주간 진탕 배양하는 경우에는 각각 2주와 1주 더 정치 배양하여 전체 배양기간이 4주가 되도록 하였다.

식물체의 재분화

소포자배양 4주후 발생한 정상 자엽배들을 2% sucrose와 0.35% Phytigel이 첨가된 B5 기본배지 (Gamborg at al. 1976)에 옮겨 광주기가 16/8 h (명/암), 온도가 25°C 인 생장기에서 배양하였다. 생장기의 광도는 형광등과 메탈램프를 이용하여 받침대 위에서 45 μmol m⁻²s⁻¹이 되도록 유지하였다.

배양 8주후 3~5개의 잎을 가진 유식물들을 화분에 옮겨 모 식물 생육 시와 동일한 조건의 생장실에서 생육 시켰다. 화분에 이식한 4주 후 1개의 화분에 1개체씩 옮겨 개화 시 까지 생육 시켰다. 공변세포의 엽록체 수를 조사하기 위해 완전히 전개된 잎 이면의 표피를 취해 슬라이드 글라스 위에 놓고 증류수나 I₂KI 용액 (iodine 2 g, KI 1 g/97 ml DW)을 떨어트린 후 2개의 공변세포 안에 있는 엽록체의 수를 계수하였다. 1개의 식물에서 3개의 잎을 취하였으며, 1개의 잎에서는 기공 10개의 공변세포에서 엽록체 수를 계수하였다.

결과조사

모든 실험은 1개의 배양접시를 1반복으로 하여 한 처리에 4~8 반복씩 3회 실시하였다. 배양 4주 후 해부 현미경 10배의 배율 하에서 각 배양 접시에서 발생한 배를 계수하여 평균과 표준오차를 구하였다.

결과 및 고찰

액체-2층 배양에서 초기 액체배양 시의 배지 첨가 효과

액체-2층 배양에서 초기 액체배양 시 새 배지의 첨가가 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 배양을 시작한 1, 3 및 5일 후에 새 배지를 첨가하였으며, 1주간 액체 배양 한 것을 고체배지로 옮겨 3주간 2층배양 한 후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 배양접시 1개에서 발생한 전체 배의 수는 새 배지를 첨가하지 않은 경우 42.6개 이었으나 첨가한 경우에는 85.5~101.6개로 2배 이상 크게 증가하였다. 새 배지 첨가 시 첨가시기에 따라 발생한 배의 수가 달랐는데 1일 후 첨가 시에는 85.5개 이었으며 3일 및 5일 후 첨가 시에는 각각 90.5개와 101.6개로 첨가 시기가 늦어질수록 많았다 (Table 1).

새 배지를 첨가하지 않은 경우 발생한 배들은 크기가

Table 1 Effect of medium addition during liquid culture in liquid-double layer culture system on the production of embryos in isolated microspore culture of *C. annuum* L.

Time point of medium addition (°DAC)	No. of embryos/plate			
	Globular & Heart	Cotyledonary	^b ELS	Total
0 (control)	9.4±3.2	2.5±3.2	31.2±14.0	42.6±15.4
1	18.3±18.7	9.9±3.4	57.4±41.6	85.5±60.2
3	19.6±17.6	7.1±2.4	63.7±39.6	90.5±60.0
5	21.4±26.1	9.2±2.2	71.0±39.0	101.6±64.6

^aDAC means days after liquid culture commenced in liquid-double layer culture system. ^bELS indicates embryo-like structure. Values are the means of three independent experiments with six replicates for each treatment. Every plate contains approximately 150,000 microspores.

비교적 작았으며, 배측과 자엽이 정상적으로 발달하지 못한 상태에서 뿌리가 발달한 것들이 많았다. 이에 비해 새 배지를 첨가하였을 때 발생한 배들은 유아 쪽과 유근 쪽이 뚜렷하게 구분 될 뿐만 아니라 배측이 정상적으로 발달하여 길이가 길어진 것들이 많았다. 새 배지의 첨가 시에도 첨가시기에 따라 배의 발달이 달랐는데 3일과 5일 후 첨가 시 발생한 배들은 1일 후 첨가 시 발생한 배들에 비해 배측이 다소 비대하였다 (Fig. 1). 배양접시 1개에서 발생한 정상 자엽배의 수는 새 배지를 첨가 하지 않은 경우 2.5개 이었으나 첨가한 경우에는 7.1~9.9개로 3배 이상 많았다. 새 배지 첨가 시에도 첨가시기에 따라 자엽배의 수가 달랐는데 1일 후 첨가 시 9.9개로 가장 많았으며 다음은 5일과 3일 순으로 각각 9.2개와 7.1개이었다 (Table 1). 그러나 5일과 1일 사이에는 큰 차이가 없었을 뿐만 아니라 실험에 따라서는 5일 후 첨가 시에 더 많은 경우도 있었다. 따라서 액체-2층 배양에서 초기 액체배양 시의 새 배지 첨가는 배의 발생과 발달에 모두 효과적이며 가장 효과적인 첨가 시기는 배양 5일 후인 것으로 나타났다.

소포자를 치상하여 배양한 배지 내에는 소포자 분열에 도움이 되는 유용한 물질 (이후 division factor라 칭함)이 들어 있으므로 conditioned medium을 사용 하면 배의 발생이 크게 증가한다 (Huang et al. 1990). 한편 배양 배지 내에는 division factor뿐만 아니라 소포자에서 방출된 자가독소 (autotoxin)도 들어 있어 소포자배의 발생을 억제하는데 배양 후 적기에 사용한 배지를 새 배지로 교환하면 배의 발생과 발달이 크게 증가한다 (Kott and Polsoni 1988). 유채의 경우 배양 1일 후 사용한 배지를 새 배지로 교환하면 자엽배의 발생이 약 2배정도 증가하며 (Kott and Polsoni 1988), 순무의 경우에도 배양 3일 후 새 배지로 교환하면 품종에 따라 차이는 있으나 배의 발생이 200~800%나 증가하며 자엽배의 발생은 최대 3배 이상 증가 한다 (Hansen and Svinnsset 1993). 그러나 배양 초기 배지를 교환하는 경우 원심분리에 의한 물리적 상해나

division factor의 소실로 인해 오히려 배의 발생이 감소하기도 한다 (Polsoni et al. 1988; Huang et al. 1990; Dias and Correia 2002; Dai et al. 2009). 따라서 배지를 교환 하는 대신 옥수수나 유채와 같은 식물들에서는 기존의 배양배지에 새 배지를 첨가하여 배양하기도 하는데 유채의 경우 배양 12일 후에 새 배지를 첨가하여 진탕배양하면 75% 이상의 배가 정상 어뢰형 배로 발달한다 (Swanson et al. 1987; Nägeli et al. 1999). 본 연구에서는 3일 간의 고온처리 후 사용한 전처리배지를 새 배양배지로 교환 하였으므로 배양초기에 발생한 독소의 대부분이 제거되었을 것이므로 배양 후 다시 배지를 교환하기보다는 새 배지를 첨가하는 것이 원심분리에 의한 물리적 상해를 받지 않고 division factor가 소실되는 것도 막을 수 있어 배의 생산에 효과적일 것으로 생각되었다. 이와 같은 가정 하에 액체-2층배양을 하면서 초기 액체배양 시에 새 배지를 첨가한 결과 배의 발생이 증가하였을 뿐만 아니라 발생한 배의 질도 크게 개선되었다. 따라서 고추의 소포자 배양 시에도 유채 (Swanson et al. 1987)에서와 같이 새 배지를 첨가하여 배양하는 것이 정상 자엽배 생산에 효과적인 것으로 밝혀졌다.

소포자 배양 시의 치상밀도는 배의 발생에 매우 크게 영향을 미치는데 일반적으로 치상당시의 밀도는 비교적 높은 것이 유리하지만 배양 중에는 치상밀도를 낮추는 것이 유리하다. 유채 (*B. napus* L. cv. Topas)의 경우 배양 초기 2~4일 동안은 소포자 밀도가 30,000~40,000 /ml로 비교적 높은 것이 좋으나 이후에는 밀도를 10,000 /ml 또는 4,000 /ml로 낮추는 것이 배의 발달에 효과적이다 (Huang et al. 1990). 본 연구에서도 소포자 밀도가 고온처리 시에는 약 200,000 /ml이었으나 배양배지에 치상할 때는 약 100,000 /ml로 고온처리 시에 비해 1/2로 감소하였다. 이후 배양 중에 다시 치상당시와 같은 양의 배지를 첨가하여 소포자의 밀도는 약 50,000 /ml로 치상당시에 비해 1/2로 감소하였다. 따라서 새 배지 첨가 시 배의 발생과 발달이 좋았던 것은 소포자배의 발달에 필요한 양

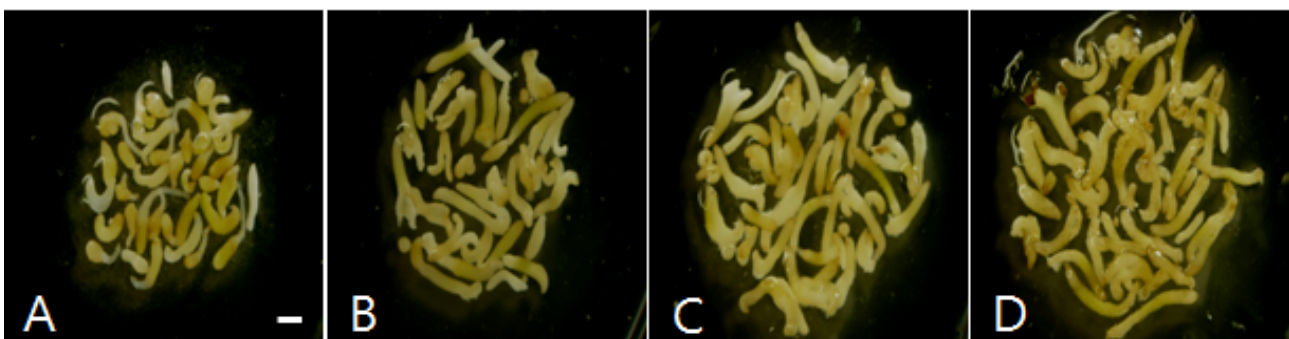


Fig. 1 Embryos developed from microspores after 4 weeks of culture. Fresh culture medium was added at different days after liquid culture commenced in liquid-double layer culture system. A) Control (without addition), B) 1 day, C) 3 days, D) 5 days. Bar (2 mm) in (A) applies to all the figures

분이 재공급되었고 배양 중 발생한 독소가 희석되었을 뿐만 아니라 소포자 밀도가 비교적 적합하게 조절되었기 때문에 생각된다.

배양 소포자들의 초기분열은 식물에 따라 다른데 옥수수의 경우 배양 3~4일 후부터 첫 번 분열이 시작되고, 5~7일 사이에는 다핵체가 발생한다 (Testillano et al. 2004; Obert et al. 2005). 또 보리의 경우에는 배양 1일 후부터 첫 번 분열이 시작되고, 3일 후에는 다핵체, 5~7일 후에는 다세포체가 발생하며 (Maraschin et al. 2005), 밀에서도 5~8일 만에 다세포체가 화분벽을 터트리고 나온다 (Indrianto et al. 2001). 유채나 *B. oleracea*에서도 배양 2~3일 후부터 분열이 시작되며 7~10일이 되면 구형이나 심장형배가 형성된다 (Polsoni et al. 1988; Dai et al. 2009). 이와 같이 식물에 따라 다소 차이는 있으나 대부분의 경우 배양 소포자들은 1~3일 사이에 분열을 시작하며 5~7일 후에는 다핵체나 다세포체로 발달하는데 고추에서도 배양 4~7일이 되면 다핵체와 다세포체들이 발생한다 (Kim et al. 2008). 이들 배양 5일 전후에 발생한 다핵체나 다세포체들이 이후 계속 분열하여 정상적인 배로 발달할 수 있으려면 이에 필요한 양분의 공급이 절대 필요하다. 본 연구에서 새 배지의 첨가시기를 배양 후 1, 3 및 5일로 달리하여 첨가한 결과 5일후 첨가 시에 배의 발생과 발달이 가장 좋았는데 이는 배양 5일 전후에 발생한 다핵체나 다세포체들이 계속 분열하여 정상 배로 발달하는데 필요한 양분이 적기에 공급되었기 때문으로 생각된다.

액체-2층 배양에서 후기 2층 배양 시의 배지 첨가 효과

액체-2층 배양에서 후기 2층 배양 시의 새 배지 첨가 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 1주간 액체 배양 한 소포자 현탁액을 고체배지로 옮긴 후 새 배지를 첨가하거나 또는 첨가하지 않은 상태에서 3주간 2층배양 한 후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 배양접시 1개에서 발생한 전체 배의 수는 새 배지를 첨가한 경우 134.9개로 첨가하지 않은 경우 125.2개이었던 것에 비해 다소 증가 하였다 (Table 2).

새 배지를 첨가한 경우 발생한 배들의 발달정도는 첨가하지 않았을 때와 비교 시 큰 차이가 없었다 (Fig. 2). 또 배양접시 1개에서 발생한 자엽배의 수도 새 배지를 첨가하지 않은 경우 15.3개 이었으나 새 배지를 첨가한 경우에는 16.9개로 큰 차이가 없었다 (Table 2). 따라서 액체-2층 배양에서 후기 2층 배양 시의 새 배지 첨가는 초기 액체배양 시 첨가 때에 비해 그 효과가 낮은 것으로 나타났다.

이와 같이 액체-2층배양에서 후기 2층 배양 시 다시 새 배지를 첨가하였을 때 그 효과가 초기 액체배양 시 첨가 때에 비해 크지 않았던 것은 본 실험 시 고온처리 후 배지를 교환 하였으며, 초기 액체배양 시 치상 당시와 같은 양의 새 배지를 첨가하였으며, 1 주간 액체배양 한 소포자 현탁액을 2층배양 하기위해 새 고체 배지로 옮겼으므로 배양배지 내에 있는 것으로 알려진 division factor (Huang et al. 1990)가 희석되었고 소포자의 밀도도 치상당시에

Table 2 Effect of medium addition during double layer culture in liquid-double layer culture system on the production of embryos in isolated microspore culture of *C. annuum* L.

Addition of medium	No. of embryos/plate			
	Globular & Heart	Cotyledonary	^a ELS	Total
Without addition	29.9±13.8	15.3±3.2	79.8±20.8	125.2±32.9
Addition	37.5±14.1	16.9±3.6	80.5±21.0	134.9±31.9

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

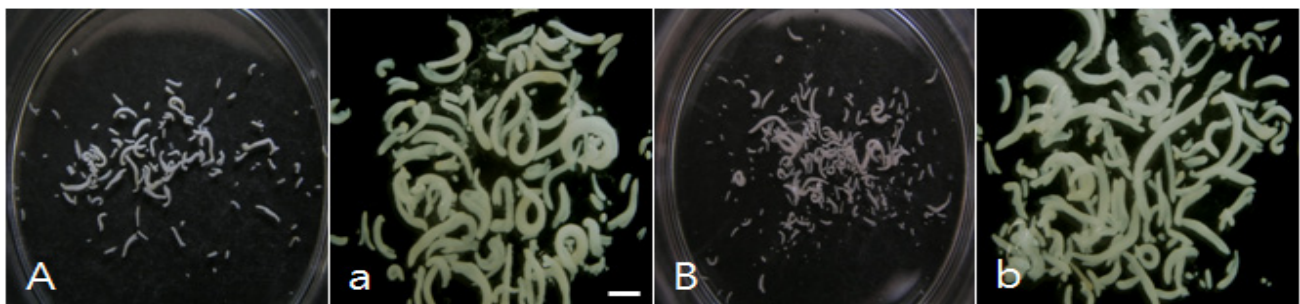


Fig. 2 Embryos developed from microspores after 4 weeks of culture. Fresh culture medium was added when the liquid culture was transferred into the double layer medium in liquid-double layer culture system. A) Control (without addition), B) Addition. A ~ B; Embryos in culture plate, a ~ b; Embryos under stereo-microscope. Bar (2 mm) in (a) also applies to (b)

비해 낮게 되었기 때문인 것으로 생각된다.

액체-2층 배양에서 후기 2층 배양 시의 진탕 효과

액체-2층 배양에서 후기 2층배양 시의 진탕 여부가 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 진탕 기간을 1, 2 및 3주간으로 달리하여 배양한 한 후 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 배양 접시 1개에서 발생한 전체 배의 수는 진탕을 하지 않은 경우 181.4개 이었으나 진탕을 한 경우에는 102.6~172.5개로 감소하였다. 감소한 정도는 진탕 기간에 따라 달랐는데 1주간 진탕한 경우에는 172.5개 이었으나 2주와 3주간 진탕한 경우에는 각각 155.6개와 102.6개로 진탕 기간이 길어질수록 많이 감소하였다 (Table 3).

진탕을 하지 않은 경우에는 구형배나 길이가 짧은 배상체가 많았으나 진탕 한 경우에 발생한 배들은 비교적 길었으며 배상체들도 길이가 긴 것들이 많았다. 진탕 한 경우에도 그 기간에 따라 배의 발달이 크게 차이가 났

데 1주간 진탕 시 발생한 배들은 배축이 비교적 가늘고 길었으며 2개의 자엽이 전개된 것들이 많았다. 이에 비해 2주나 3주 동안 진탕한 경우에 발생한 배들은 배축이 짧고 비대하였으며 유근 쪽에서는 가늘고 긴 뿌리들이 발생하였고 자엽이 전개된 것들은 매우 드물었다 (Fig. 3). 배양 접시 1개에서 발생한 정상 자엽배의 수는 진탕 하지 않은 경우 11.1개 이었으나 1주간 진탕한 경우에는 13.7개로 증가하였다. 그러나 2주 및 3주간 진탕한 경우에 발생한 자엽배의 수는 각각 4.9개와 2.9개로 진탕 기간이 길어질수록 감소하였는데 1주간 진탕한 경우에 비해 2주 진탕 시에는 약 1/2.7 이하로 3주 진탕 시에는 약 1/4.7 이하로 감소하였다 (Table 3). 따라서 액체-2층 배양에서 후기 2층배양 시의 1주간 진탕은 정상 자엽배 생산에 매우 효과적이거나 2주 이상의 진탕은 배의 발생과 발달 모두에 효과가 없는 것으로 나타났다.

대부분의 경우 배지에 치상한 소포자들은 온도가 일정하게 유지되는 배양기 내에 정착하여 배양하지만 옥수수 (Nägeli et al. 1999), 보리 (Hoekstra et al. 1992), 유채 (Ferrie

Table 3 Effect of agitation during double layer culture in liquid-double layer culture system on the production of embryos in isolated microspore culture of *C. annuum* L.

Agitation period (wk)	No. of embryos/plate			
	Globular & Heart	Cotyledonary	^a ELS	Total
0 (control)	72.2±56	11.1±3.9	98.1±40.1	181.4±100
1	34.5±2.9	13.7±6.5	122.3±66.9	172.5±78.3
2	38.6±9.2	4.9±1.5	112.1±65.1	155.6±75.8
3	24.6±1.8	2.9±1.9	75.1±32.3	102.6±35.4

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

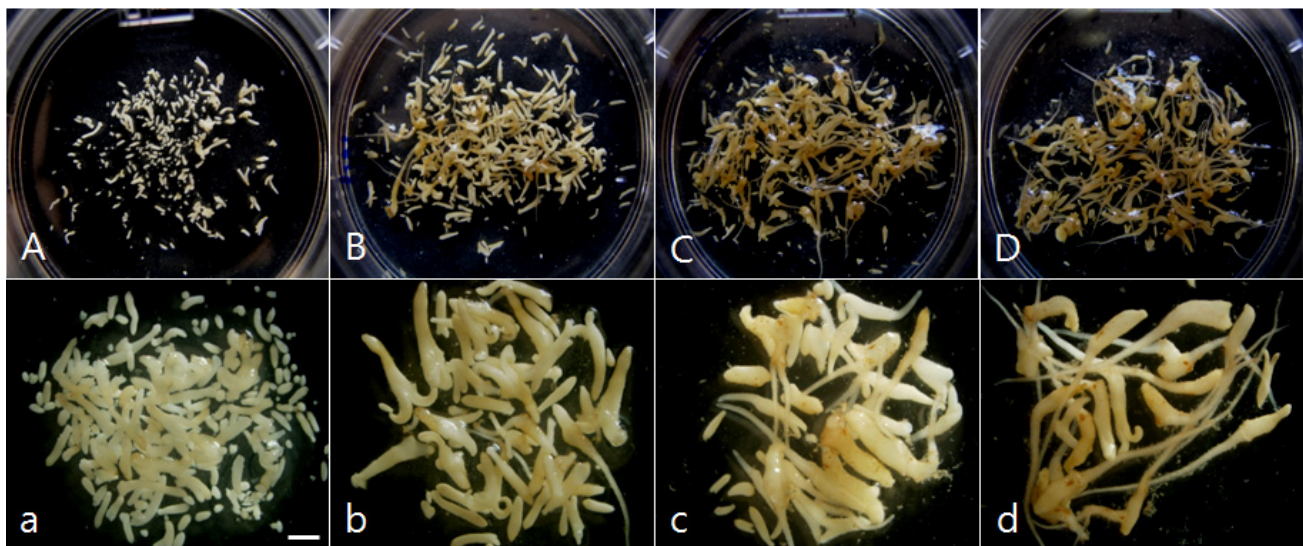


Fig. 3 Embryos developed from microspores after 4 weeks of culture. Agitation during double layer culture in liquid-double layer culture system was done for different period. A) Control (without agitation), B) 1 week, C) 2 weeks, D) 3 weeks. A~D; Embryos in culture plate, a~d; Embryos under stereo-microscope. Bar (2 mm) in (a) also applies to b~d

et al. 1995)와 같은 식물들에서는 배양 중 일정 기간 진탕을 하기도 한다. 이와 같이 배양 중 일정 기간 진탕을 하는 경우 배의 발달이 좋은 것으로 알려져 있는데 유체의 경우 배양 2주후부터 진탕배양 하면 정치배양 시에 비해 배의 발달이 빠르게 또 동조적으로 일어나서 진탕을 시작한 1주일 후의 자엽배 발생 비율이 정치배양 시에는 16%이나 진탕 시에는 41%로 크게 증가한다. 또 배양 12일 후 배지를 첨가하여 진탕배양하면 구형, 심장형 배들이 더욱 빠르게 발달하는데 발생한 배들 중 75%가 정상 어뢰형배들이다 (Swanson et al. 1987; Polsoni et al. 1988). 본 연구에서도 액체-2층 배양에서 후기 2층배양 시 1주간 진탕하였을 때 배의 발달이 좋았으며 자엽배의 발생도 많았다. 따라서 유체에서와 같이 고추의 소포자 배양 시에도 배양 중 진탕은 배의 발달에 매우 효과적인 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 배양 중 진탕이 배의 발달에 좋았던 것은 aeration이 잘되었기 때문으로 생각된다. 또 정치배양 시에는 소포자나 다세포체 주변에서는 이들의 물질대사 결과 양분 결핍이 더 심하게 일어나지만 진탕 시에는 배지 전체의 양분 상태가 균일해 지기 때문에 배의 발달이 보다 빠르게 또 동조적으로 일어나는 것으로 생각된다.

액체 배양 시의 진탕 효과

액체 배양 시의 진탕여부가 배의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 소포자를 치상 한 1주일 후부터 1, 2 및 3주간으로 기간을 달리하여 진탕 배양하였으며 배양 4주 후에 배의 발생 및 발달을 조사하였다. 배양 접시 1개에서 발생한 전체 배의 수는 진탕을 하지 않은 경우에는 157.4개이었으나 진탕을 한 경우에는 158.9~171.3개로 다소 증가하였다. 진탕 시에도 그 기간에 따라 배의 발생이 달랐는데 1주간 진탕한 경우에는 171.3개로 진탕하지 않은 경우에 비해 비교적 많이 증가하였으나 2주와 3주간 진탕한 경우에는 각각 158.9개와 159.1개로 진탕하지 않았을 때에 비해 차이가 거의 없었다 (Table 4).

진탕 한 경우에 발생한 배나 배상체들은 진탕을 하지 않았을 때에 비해 크기가 컸다. 또 진탕 기간에 따라 배의 발달이 차이가 났는데 1주간 진탕 시 발생한 배들은 길이가 다소 길어졌으나 2주나 3주 동안 진탕한 경우에는 배축의 상부 즉 유아 쪽이 자엽으로 발달하는 대신 구형으로 되고 유근 쪽에서는 가늘고 긴 뿌리가 발생한 것들이 많았다 (Fig. 4). 배양 접시 1개에서 발생한 정상 자엽배의 수는 진탕 하지 않은 경우 0.4개 이었으나 1주간

Table 4 Effect of agitation during liquid culture on the production of embryos in isolated microspore culture of *C. annuum* L.

Period of agitation (wk)	No. of embryos/plate			
	Globular & Heart	Cotyledonary	^a ELS	Total
0 (control)	124±21.0	0.4±0.3	31.6±23.6	157.4±7.2
1	92.3±25.4	2.1±0.4	76.7±26.0	171.3±22.9
2	72.6±19.8	0.7±0.5	85.7±16.5	158.9±27.8
3	102.7±17.1	0.7±1.0	55.6±28.9	159.1±44.4

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

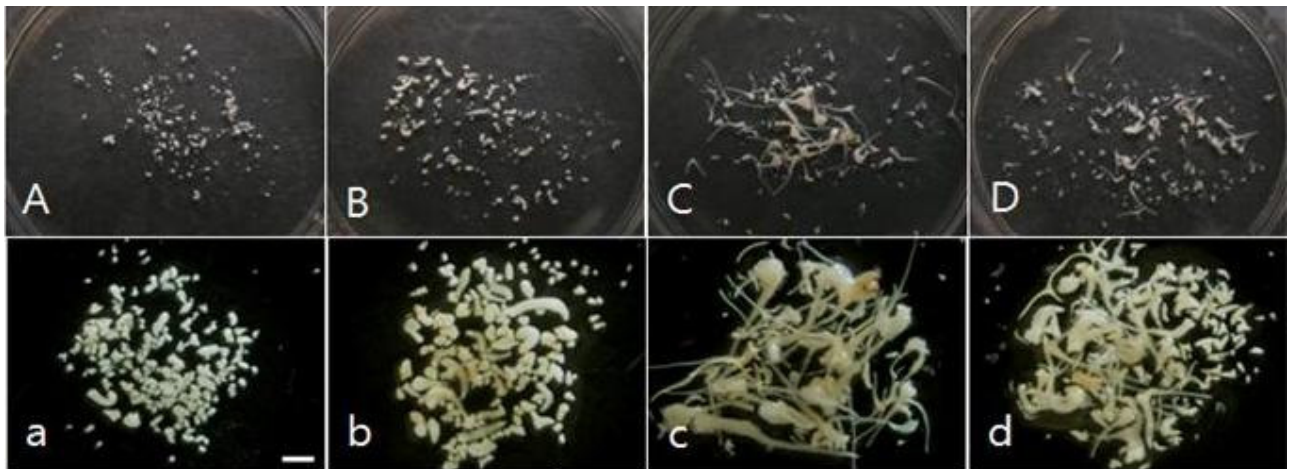


Fig. 4 Embryos developed from microspores after 4 weeks of liquid culture. Agitation during liquid culture was done for different period. (A) Control (without agitation), B) 1 week, C) 2 weeks, D) 3 weeks. A ~D; Embryos in culture plate, a ~d; Embryos under stereo-microscope. Bar (2 mm) in (a) also applies to b ~d

진탕한 경우에는 2.1개로 5배 이상 증가하였다. 그러나 2주나 3주간 진탕 시 모두 각각 0.7개로 진탕을 하지 않았을 때와 비교 시 큰 차이가 없었다 (Table 4). 따라서 액체 배양 시에도 1주간 진탕은 배의 발생과 발달에 효과적이거나 2주 이상의 진탕은 효과가 없는 것으로 나타났다.

접합자 배의 발생 시에는 수정란이 식물 종 고유의 정해진 양식에 따라 규칙적으로 분열하여 배가 형성되는데 초기부터 apical-basal pattern이 이루어져서 유아 쪽과 유근 쪽이 뚜렷하다 (Mordhorst et al. 1997). 이와는 달리 일반적인 소포자 배의 발생 시에는 식물 종 고유의 정해진 양식에 따라 규칙적으로 분열하는 대신 불규칙하게 분열하여 분열능이 높은 세포집단 (embryonic mass)이 만들어지고 이들 원배 (proembryo)가 화분의벽을 터트리고 나온 후 원표피 (protoderm)가 형성되면서 구형배로 발달한다. 조직의 분화는 이후부터 시작되어 유근 쪽과 유아 쪽이 뚜렷하게 되며 심장형배와 어뢰형 배의 단계를 거쳐 자엽배로 발달한다 (Mordhorst et al. 1997; Joosen et al. 2007; Supena et al. 2008). 그러나 소포자 배의 발생 시에도 접합자배의 발생 시와 유사하게 배병유사구조 (suspensor-like structure)가 발달하기도 하는데 이와 같은 경우 초기분열 시부터 극성이 생기며 배병유사구조가 있는 쪽에서 유근이 발달하는데 이들은 대부분이 정상배로 발달한다 (Joosen et al. 2007; Supena et al. 2008). 이와 같이 소포자 배양 시 배의 발생은 배병유사구조가 발달하는 경우에서처럼 발생 초기부터 극성이 생기거나, 배병유사구조가 발달하지 않는 일반 소포자 배의 발생 시에서와 같이 구형배 시기 이후부터 생기거나 하는 시기적 차이는 있으나 유아 쪽과 유근 쪽의 극성이 이루어질 때 정상 자엽배로 발달한다. 배양 중 지나친 진탕은 극성 형성에 영향을 미칠 수 있으므로 진탕 기간과 시기에 따라 그 효과가 달라질 수 있을 것으로 생각되는데 진탕 효과가 큰 것으로 알려진 유체의 경우 소포자배양을 시작한 12~14일 후부터 1주일간 진탕하면 구형 및 심장형배들이 동조적으로 또 빠른 속도로 정상 자엽배로 발달한다 (Swanson et al. 1987; Polsoni et al. 1988). 본 연구에서도 액체-2층 배양에서와 액체배양 시 모두 1주간 진탕 시에는 자엽배의 발생이 많았다. 그러나 진탕기간이 2~3 주간으로 길어지는 경우에는 비정상 배들의 발생이 많았는데 이는 진탕기간이 길어짐으로 인해 유아 쪽과 유근 쪽의 극성이 정상적으로 형성되지 못하였기 때문으로 생각된다.

진탕목적에 따라 배양 중 진탕을 시작하는 시기가 다른데 *Brassica* 속에 속한 종들에서 toxin을 희석시키기 위한 목적으로 진탕하는 경우 특별히 고안된 진탕기를 이용하여 소포자 배양초기 즉 배양을 시작한 3일 후부터 시작하면 사용한 모든 종에서 배의 수가 증가 하며 진탕이 7일이나 10일로 늦어지는 경우에는 배의 발생이 거의 없다 (Lichter 1989). 또 유체의 소포자 배에서 저장지방의

생성과 질을 조사할 목적으로 발육정도가 다양한 배들을 동조화시키기 위해 진탕하는 경우 배양 26일 후부터 시작하여 15일 간 진탕하면 동일한 flask 안에 있는 배들의 크기가 비슷하게 된다 (Wiberg et al. 1991). 그러나 정상 자엽배 생산이 목적인 경우 그 효과가 높은 것으로 알려진 유체에서는 육안으로 구형이나 심장형배를 관찰할 수 있는 시기 즉 배양 12~14일 후부터 시작하여 1주일간 한다 (Swanson et al. 1987; Polsoni et al. 1988). 본 연구에서는 배양 1주일 후부터 진탕을 시작하였는데 이 시기는 소포자가 다핵체나 다세포체로 된 시기로 (Kim et al. 2008) 구형이나 심장형배를 육안으로 관찰하는 것이 어렵다. 따라서 진탕기간이 2~3 주간으로 길어지는 경우 비정상 배의 발생이 많았던 원인 중 하나는 극성이 확립되지 않은 이른 시기부터 장기간 진탕을 하였기 때문인 것으로 생각된다. 앞으로 정상 자엽배 생산에 효과적인 진탕조건을 확립하기 위해 진탕을 시작하는 시기와 그 기간을 밝힐 수 있는 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

재분화

본 실험 결과 발생한 정상 자엽배들은 재분화 배지에 이식 시 용이하게 유식물로 발달하였다. 재분화 배지에 이식 한 후 8주가 되면 잎이 3~5매 이상인 유식물들로 발달하였는데 이들은 뿌리의 발달도 좋아서 화분에 옮겨갈 때 용이하게 활착하였다 (Fig. 5A~C). 화분에서 생육된 어린 식물들을 각각의 화분에 정식하여 생육 후기가 되면 고추가 열리는 것들도 있었다. 고추가 열린 것으로 미루어 보아 배가반수체로 추정되는 식물들은 고추가 열리지 않아 반수체로 추정되는 식물들에 비해 잎이 크고 넓었다 (Fig. 5). 배가반수체와 반수체로 추정되는 식물들의 잎을 취해 2개의 공변세포 내 엽록체 수를 조사한 결과 반수체로 추정되는 식물들에서는 8~11개 이었으나 배가반수체들에서는 15~18개 이었다 (Fig. 5D~F).

고추에서는 소포자 유래의 반수체와 배가반수체 간에 공변세포 내 엽록체 수가 뚜렷하게 차이가 나므로 생육 초기에 이들을 계수함으로써 비교적 용이하게 반수체와 배가반수체를 구분할 수 있다 (Supena et al. 2006; Qin and Rotino 1995). 그러나 본 실험에서는 고추의 생성 유무로 반수체와 배가 반수체로 추정되는 식물 2 개체만을 선정하여 조사하였으며, 또 공변세포의 엽록체 수는 식물 생육 상태에 따라 차이가 커서 이것만으로는 반수체와 배가반수체를 구별하기가 어려운 경우도 있으므로 현재 재분화 된 식물체들의 엽록체 수와 형태적 특성들을 조사 중에 있다.

본 연구 결과 배양 중 새 배지의 첨가와 진탕에 의해 배의 질을 크게 높일 수 있게 되었으며, 가장 효과적인 배지 첨가 시기는 액체-2층배양에서 초기 액체배양을 시

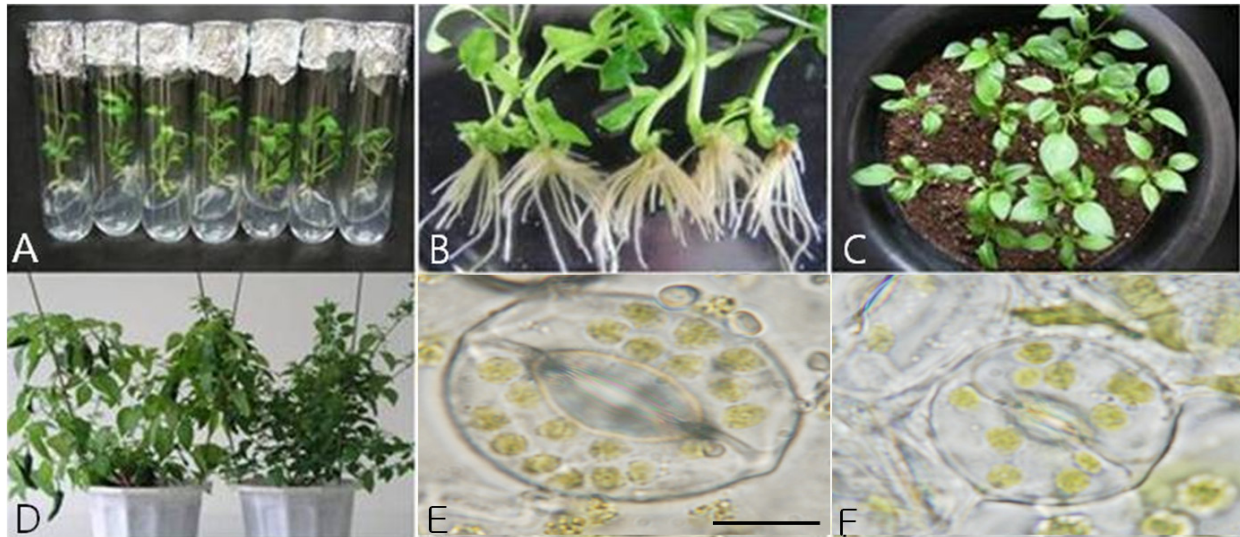


Fig. 5 Plant regeneration. (A) Plantlets developed from embryos after 7 weeks on solid B5 medium. (B) Plantlets showing adequate root development enough to transfer to soil. (C) Young plants in the pot. (D) Adults plants in the pot. Plant on the left was doubled haploid with fruits, while plant on the right was haploid. (E) Chloroplasts in guard cells of doubled haploid. (F) Chloroplasts in guard cells of haploid. Bar (10 μm) in (E) also applies to (F)

작한 5일후이고 진탕 기간은 액체-2층배양과 액체배양 시 모두 배양을 시작한 1주일 후부터 1주간임을 밝힐 수 있었다. 이와 같은 결과들은 다수의 정상자엽배를 생산할 수 있는 고추의 소포자배양 시스템을 확립하는데 귀중한 기초자료가 될 것이다.

적 요

본 연구에서는 고추의 나출 소포자 배양 시 배양 중 새 배지의 첨가와 진탕이 배의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 액체-2층 배양에서 초기 액체배양 시에 새 배지를 첨가하면 배의 발생과 발달 모두 크게 증가하였다. 가장 효과적인 첨가 시기는 초기액체 배양을 시작한 5일 후 이었다. 한편 액체-2층 배양에서 후기 2층배양 시의 새 배지 첨가는 초기 액체배양 시 첨가 때에 비해 그 효과가 적었다. 액체-2층 배양에서 후기 2층배양 시의 1주간 진탕은 정상 자엽배 생산에 효과적이었다. 액체배양 시에도 배양 1주 후의 1주간 진탕은 배의 발달에 효과적이었다. 그러나 액체-2층배양 시와 액체배양 시 모두 진탕기간이 2~3 주간으로 길어질 때에는 배의 발달이 비정상적이었다. 본 실험 결과 얻어진 정상 자엽배들은 재분화 배지에 이식 시 용이하게 유식물체로 발달하였다. 재분화 식물체들 중에는 반수체와 배가반수체가 혼재하였으며, 이들 간에는 공변세포 내 엽록체 수의 차이가 뚜렷하였다. 이와 같은 결과들은 고추에서 다수의 정상자엽배를 생산할 수 있는 소포자 배양 시스템을 확립하는데 중요한 기초자료가 될 것이다.

인용문헌

- Custers JBM, Cordewener JHG, Fiers MA, Maassen BTH, van Lookeren Campagne MM, Liu CM (2001) Androgenesis in brassica, a model system to study the initiation of plant embryogenesis. In: Bhojwani SS, Soh WY (eds) Current trends in the embryology of angiosperms. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 451-470
- Dai XG, Shi XP, Fu Q, Bao MZ (2009) Improvement of isolated microspore culture of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *Acephala*): Effects of sucrose concentration, medium replacement, and cold pre-treatment. J Horticult Sci Biotechnol 84: 519-525
- Dias JS, Correia MC (2002) Effect of medium renovation and incubation temperature regimes on tronchuda cabbage microspore culture embryogenesis. Sci Hortic 93:205-214
- Davies PA, Morton S (1998) A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. Plant Cell Reports 17:206-210
- 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 Reports 14:580-584
- Gamborge O, Murashige T, Thorpe A, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. In Vitro 12:473-478
- Hansen M, Svinnsset K (1993) Microspore culture of swede (*Brassica napus* ssp. *rapifera*) and the effects of fresh and conditioned media. Plant Cell Reports 12:496-500
- 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 (2004) In vitro androgenesis in apple: improvement of the induction phase. Plant Cell Reports 22:365-370

- Huang B, Brid S, Kemble R, Simmonds D, Keller W, Miki B (1990) Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Reports* 8:594-597
- Indrianto A, Barinova I, Touraev A, Heberle-Bors E. (2001) Tracking individual wheat microspores in vitro : identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta* 212:163-174
- Jähne A, Lörz H (1995) Cereal microspore culture. *Plant Sci* 109:1-12
- Joosen R, Cordewener J, Supena EDJ, Vorst O, Lammers M, Maliepaard C, Zeilmaker T, Miki B, America T, Custers J, Boutilier K (2007) Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and robust markers associated with the establishment of *Brassica napus* microspore-derived embryo development. *Plant Physiol* 144:155-172
- Kasha KJ, Kao KN (1970) High frequency haploid production in barley (*hordeum vulgare* L.). *Nature* 225:874-876
- Kim M, Kim J, Yoon M, Choi DI, Lee KM (2004) Origin of multicellular pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77:63-72
- 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 Reports* 27:425-434
- Kim M, Park EJ, Lee Y (2010) Increased embryo production by manipulation of pretreatment materials and media in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). In: *Recent advances in plant biotechnology*, (ed) Kumar A, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi, India.
- Kott LS, Polsoni L, Ellis B, Beversdorf WD (1988) Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. *Can J Bot-Rev Can Bot* 66:1665-1670
- Lantos C, Juhász AG, Somogyi G, Ötvös K, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N, Pauk J (2009) Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 97:285-293
- Lichter R (1989) Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. *Plant Breed* 103:119-123.
- Liu W, Zheng MY, Konzak CF (2002) Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* 20:821-824.
- Maraschin SF, Gaussand G, Pulido A, Olmedilla A, Lamers GEM, Korthout H, Spaik HP, Wang M (2005) Programmed cell death during the transition from multicellular structures to globular embryos in barley androgenesis. *Planta* 221:459-470
- Mordhorst AP, Toonen MAJ, De Vries SC (1997) Plant embryogenesis. *Crit Rev Plant Sci* 16:535-576
- Nägeli M, Schmid JE, Stamp P, Buter B (1999) Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize; impact of carbohydrates, plating density and time of transfer. *Plant Cell Reports* 19:177-184
- Obert B, Szabó L, Mitykó J, Preťová A, Barnabás B (2005) Morphological events in cultures of mechanically isolated maize microspores. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:775- 782
- Park EJ, Kim JA, Kim M (2009) 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.). *J Plant Biotechnol* 36:184-192
- Park EJ, Lee JS, An DJ, Kim M (2010) The effect of medium change after pretreating microspores, medium addition, and volume of under solid medium in double layer culture on the production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Plant Biotechnol* 37:494-504
- Polsoni L, Kott LS, Beversdorf WD (1988) Large-scale microspore culture technique for mutation selection studies in *Brassica napus*. *Can J Bot-Rev* 66:1681-1685
- Qin X, Rotino GL (1995) Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro-grown androgenic pepper plantlets. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 41:145-149
- Raina Sk, Irfan ST (1998) High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice. *Plant Cell Reports* 17:957-962
- Regner F (1994) Microspore culture of *Capsicum annuum*. *Capsicum and Eggplant Nwsl* 13:72-73
- 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 Academic Publ, Dordrecht the Netherlands:77-89
- 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
- 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 Reports* 25:1-10
- Supena EDJ, Winarto B, Riksen T, Dubas E, Lammeren A, Offringa R, Boutilier K, Custers J (2008) Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *J Exp Bot* 59:803-814
- 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 (1990) Microspore culture in Brassica : In JW Pollard and JM Walker (eds) *Methods in molecular biology*, Vol. 6, Plant cell and tissue culture. Humana Press New Jersey: 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
- Testillano P, Georgiev S, Mogensen HL, Coronado MJ, Dumas C, Risueno MC, Matthys-Rochon E (2004) Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during in vitro maize induced microspore embryogenesis. *Chromosoma* 112:342-349

- Touraev A, Ilham A, Vicente O, Heberle-Bors E (1996) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports* 15:561-565
- Touraev A, Vicente O, Heberle-Bor E (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci* 2:297-302
- Wiberg E, Råhlen L, Hellman M, Tillberg E, Glimelius K, Szymne S (1991) The microspore-derived embryo of *Brassica napus* L. as a tool for studying embryo-specific lipid biogenesis and regulation of oil quality. *Theor Appl Genet* 82:515-520