

## 국내 육성 품종 ‘탐미유채’의 소포자 배양 시 배양조건이 배발생에 미치는 영향

김광수<sup>†</sup> · 이영화 · 조현준 · 장영석 · 박광근  
농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터

### Effects of Culture Condition on Embryogenesis in Microspore Culture of *Brassica napus* L. Domestic Cultivar ‘Tammiyuchae’

Kwang-Soo Kim<sup>†</sup>, Yong-Hwa Lee, Hyeon-Jun Cho, Young-Seok Jang, and Kwang-Geun Park

Bioenergy Crop Research Center, National Institute of Crop Science, Muan 534-833, Korea

**ABSTRACT** For the establishment of an efficient embryogenesis from microspore culture in *Brassica napus* L. domestic cultivar ‘Tammiyuchae’, four different factors affecting microspore embryogenesis and plantlet regeneration were investigated. The highest embryogenesis rate was achieved when microspores at late uninucleate to early binucleate stage were isolated from flower buds with a length of 3.0~3.5 mm. On average, 388 embryos generated from 1 ml of microspores media. The highest number of embryos was obtained when microspores were subjected to 32.5°C for 2 days. Embryogenesis of ‘Tammiyuchae’ was increased with increasing microspore culture density up to about  $5 \times 10^4$  ea/mL. Gradually higher culture density repressed embryogenesis of microspores. Regeneration rate of shoots from microspore-derived embryos was observed in MS solid medium supplemented with 0.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA and 1.0 mg · L<sup>-1</sup> BA, and grew well in MS solid medium without plant growth regulators.

**Keywords** : *Brassica napus*, microspore culture, embryogenesis, heat treatment, culture density, regeneration

**유채**(*Brassica napus* L.)는 식용유와 바이오디젤의 원료로 이용되고 경관용 작물로서도 관심이 높아지고 있어 최근 재배면적이 크게 늘어나고 있다. 최근 유채의 육종 방향은 식용유 및 바이오디젤용으로 적합한 품종의 육성을 위해 지방산 중 단일불포화산인 올레인산의 함유량이 높으며 조기에 수확할 수 있는 유채 품종을 육성하는데 연구를 집중하고 있으며, 주로 전통적인 방법인 교배와 선발을 통해 육종하

고 있다. 교배육종은 교배가 가능한 동일한 종이나 속 내의 식물로 한정이 되어 있어 시간이 오래 걸리며 비교적 넓은 면적의 경지가 필요하다. 특히, 유채는 타가수분을 주로 하는 복이배체 작물로 유전자의 구성이 매우 복잡하여 육종에는 많은 시간과 경비가 소모된다. 이와 같은 문제점들을 해결하기 위해 기내에서의 지방, 약 및 소포자 배양 등을 통해 반수체를 형성한 후 염색체의 배가를 통한 동형접합자를 이용하여 육종기간을 단축하려는 연구가 계속되어 왔다. 소포자 배양을 통한 배발생은 모식물체의 생육환경(Dunwell *et al.*, 1985; Lo & Paules, 1992) 뿐만 아니라 기내배양조건 등의 환경적인 요인(Takahata & Keller, 1991; Gu *et al.*, 2004) 및 품종 등 유전적인 요인에 의해 크게 영향을 받는다(Thurling & Chay, 1984; Wan *et al.*, 2011). 유채는 크게 추파형과 추파형으로 구분되며 소포자배 발생률은 추파형에 비해 추파형이 비교적 높은 것으로 보고되고 있다(Chuong *et al.*, 1988; Jang *et al.*, 1997). 국내에서도 유채 소포자 배양에 대한 연구가 진행되고 있으나, 육성된 유채 품종 대부분이 추파형 유채로 소포자배의 발생빈도가 낮다(Bang *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2008). ‘탐미 유채’(Jang *et al.*, 1997)는 1996년에 육성된 고정종으로 꽃이 크고 색이 짙어 최근에 경관을 목적으로 가장 많이 재배되고 있으나, 국내 육성 타품종에 비해 소포자 배의 발생률이 낮아(Kim *et al.*, 2008) 소포자배 발생률 향상을 위한 배양조건의 확립과 발생양상 등의 연구가 필요하다.

본 연구에서는 국내 육성 유채 품종의 소포자 배양체계의 확립을 통해 육종에 적용하고자, ‘탐미유채’를 대상으로 소포자 배양 시 적당한 꽃봉오리의 크기, 고온처리시간, 배양

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-61-450-0133 (E-mail) [ajuga@korea.kr](mailto:ajuga@korea.kr)

<Received 9 July, 2012; Revised 28 August, 2012; Accepted 18 September, 2012>

밀도, 기내증식 등의 배양조건이 소포자배 발생과 식물체 재분화에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 연구에 사용한 유체는 작물과학원 목포시험장(현; 국립식량과학원 바이오에너지작물센터)에서 육성한 ‘탐미유채’를 이용하였다. 유채 종자를 바이오에너지작물센터 포장에 10월 초에 파종하여 본엽이 7~8매 정도 전개된 식물체를 11월말에 비닐하우스 내에 정식하고 하우스 온도를 20~25°C/10°C(주/야)로 조절하면서 재배하였다.

### 소포자 핵 발달단계 관찰

소포자 핵의 발달단계를 관찰하기 위해 꽃봉오리의 크기에 따라 2.0 mm 이하, 2.1~2.5 mm, 2.6~3.0 mm, 3.1~3.5 mm, 3.6~4.0 mm 및 4.1 mm 이상으로 분리, 수집한 후 꽃봉오리를 Carnoy's 용액(Acetic acid : Ethyl-alcohol, 1 : 3)에 24시간 고정하였다. 고정한 꽃봉오리를 균질화한 다음 42 µm nylon mesh를 이용하여 여과하여 소포자를 분리하였다. 분리한 소포자는 증류수로 3회 세척한 후, 3%의 sucrose가 첨가된 1 mL의 MS (Murashige & Skoog, 1962) 액체배지에 현탁하고, 10 µL의 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 염색액을 첨가하여 2~3분간 반응시킨 후 형광현미경(JP/E-600, Nikon)하에서 관찰하였다.

### 소포자 분리 및 기내배양

개화가 시작될 때의 화서를 절취하여 꽃봉오리를 크기별로 6개 집단(2.0 mm 이하, 2.1~2.5 mm, 2.6~3.0 mm, 3.1~3.5 mm, 3.6~4.0 mm 및 4.1 mm 이상)으로 나누어 수집하였다. 표면살균을 위해 꽃봉오리를 70%의 에틸알코올에 2분간, 2%의 차아염소산나트륨 용액에 10분 표면살균한 후 멸균수로 5회 세척하고 멸균된 흡습지를 이용하여 물기를 제거하였다. 100 mL 유리비커에 표면살균한 10개의 꽃봉오리를 넣고 13%의 sucrose가 첨가된 B5배지(Gamborg *et al.*, 1968)를 10 mL 첨가한 후 균질기로 꽃봉오리를 으개어 42 µm의 nylon-mesh로 여과한 후 15 mL의 falcon-tube에 담아 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 소포자를 분리하였다. 활력이 높은 소포자를 분리하기 위하여 24/32/40%의 percoll을 이용하여 농도구배 원심분리 후 32%의 percoll 층에 분리된 소포자만을 수집하였다. 혈구계수기(haemocytometer)를 이용하여 소포자의 밀도를 측정하고, 배양 밀도가 각각  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  개/mL,  $5 \times 10^5$  개/mL가 되도록

$1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의  $\alpha$ -Naphthalene acetic acid (NAA)와  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 6-Benzyl amino purine(BA) 및 13% sucrose가 첨가된 NLN배지(Nitsch & Nitsch, 1967)에 현탁하여 35 mm×10 mm 일회용 배양접시에 3 mL씩 분주하였다. 배양 초기에 온도를 32.5°C에서 0, 1, 2, 3, 5일 간 암상태로 열처리 한 후, 계속하여 25°C 암배양하면서 소포자배 발생 양상을 조사하였다.

### 식물체 재분화

배양 4주 후 형성된 소포자배를  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA와  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 BA가 첨가된 NLN액체배지가 들어있는 삼각플라스크에 80rpm으로 현탁배양하였다. 성숙한 소포자배는 식물체로의 재분화를 유도하기 위해 식물생장조절제인 NAA와 BA가 0.1~2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 농도로 단독 또는 조합 첨가된 MS고체배지(3% suc.)에 치상하여 25°C에서 16 h/day 광주기로 배양하면서 소포자배로부터 식물체의 재분화 양상을 조사하였다. 소포자배로부터 발달한 식물체는 4주 간격으로 식물성장조절제가 첨가되지 않은 MS고체 배지에 이식하여 계대배양을 하였다.

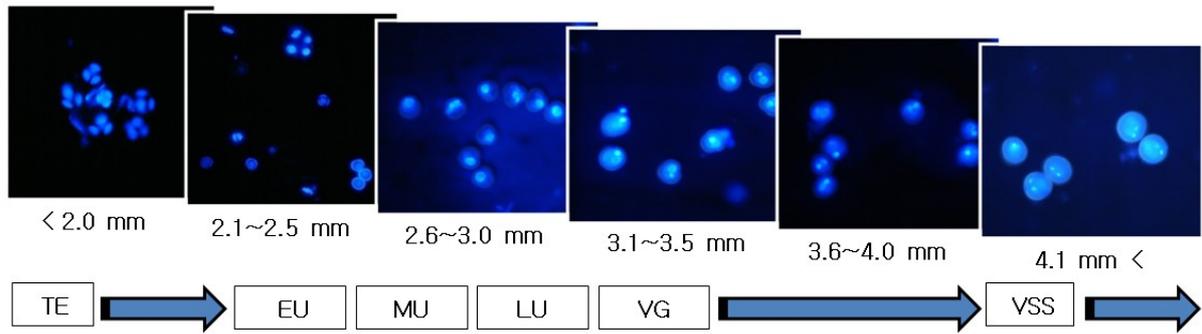
## 결과 및 고찰

### 소포자 핵 발달

소포자 배양 시 효율적인 배발생을 위해 꽃봉오리의 크기에 따른 소포자 내의 핵발달 단계의 조사가 반드시 필요하다. 국내 육성 품종인 ‘탐미유채’의 꽃봉오리 크기에 따른 핵발달 단계는 2.0 mm 이하에서는 대부분 사분자기(tetrad) 상태였으며, 2.1~2.5 mm에서는 사분자기와 1핵기(uninucleate) 초기, 2.6~3.0 mm일 때는 1핵기 초, 중, 후기, 3.1~3.5 mm일 때는 1핵기 후기와 2핵기(binucleate) 초기의 소포자가 혼재하고 있었으며, 3.6~4.0 mm일 때는 2핵기 말기와 3핵기(trinucleate)의 소포자가, 4.1 mm 이상에서는 영양핵과 2개의 생식핵으로 나누어지는 3핵기의 소포자가 많았다(Fig. 1, Table 1). 특히, 2.6 mm에서 4.0 mm사이의 꽃봉오리에서의 핵 발달 단계가 1핵기에서 3핵기로의 진행이 매우 빠르게 진행됨을 확인할 수가 있었다. 이는 Jang *et al.*(1997)이 보고한 국내 육성 추파형 품종인 ‘한라유채’의 화퇴 크기에 따른 핵 발달 단계와 비슷한 결과를 보였으나, 춘파형 품종 ‘Lisandra’와 종이 다른 *B. juncea*, *B. campestris*의 화분 핵 발달과정과는 다른 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다.

### 소포자배 발생

‘탐미유채’의 소포자 배양 시 꽃봉오리의 크기에 따른 배



**Fig. 1.** Different nuclear development stage of microspore dependent on flower bud sizes of ‘Tammiyuchae’. TE; tetrad stage, EU; early uninucleate stage, MU; mid uninucleate stage, LU; late uninucleate stage, VG; Binucleate stage (vegetative and generative nuclei present), VSS; Trinucleate stage (vegetative and two generative nuclei present).

**Table 1.** Comparison of the frequency of microspore nuclear development stage and effect on microspore embryogenesis according to flower bud size in ‘Tammiyuchae’. TE; tetrad stage, EU; early uninucleate stage, MU; mid uninucleate stage, LU; late uninucleate stage, VG; Binucleate stage (vegetative and generative nuclei present), VSS; Trinucleate stage (vegetative and two generative nuclei present).

Flower-bud size (mm)	Microspore nuclear development stage (%)						No. of embryos/ml (±SD)
	TE	EU	MU	LU	VG	VSS	
< 2.0	80.1	19.9					-
2.1~2.5	30.3	60.8	8.9				-
2.6~3.0		30.3	40.8	20.9	8.0		56.6 ± 8.1
3.1~3.5		5.3	15.4	43.3	33.7	2.3	388.3 ± 44.5
3.6~4.0			11.3	15.3	45.1	28.3	220.0 ± 33.0
4.1 <					5.4	94.6	-

\* Means and standard deviations were calculated from three replicates.

발생률을 조사한 결과, 2.6 mm에서 4.0 mm까지의 꽃봉오리에서 채취한 소포자에서 배발생이 확인되었고, 1핵기 후기와 2핵기 시기가 약 77.0%를 차지하고 있는 3.1~3.5 mm 크기의 꽃봉오리에서 채취한 소포자에서 배지 1 mL 당 388 개의 소포자배가 발생하여 가장 높은 배발생률을 나타냈으며, 3.6~4.0 mm의 꽃봉오리에서 채취한 소포자에서 배지 1 mL 당 220개의 소포자배가 발생하였다. 한편, 꽃봉오리의 크기가 2.5 mm 이하와 4.1 mm 이상에서 채취한 소포자의 경우 배발생이 전혀 관찰되지 않았는데 이는 화분 내의 핵 발달시기 중 사분자기, 1핵기 초기 및 3핵기 시기에는 배발생이 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다(Table 1). Ferrie & Keller(1995)는 소포자의 배발생은 꽃봉오리의 크기에 따라 크게 달랐으며, 배발생에 적합한 핵발달 시기는 1핵기 후기에서 2핵기 초기라고 하였는데, 본 연구 결과에서도 1핵기 말부터 2핵기 초기 사이에서 핵 발달단계에서 배발생이 가장 활발함을 확인할 수 있었다.

배양초기의 열처리(고온배양)는 소포자의 초기 분열과 배발생을 촉진하는 주요 요인으로 알려져 있다. 본 연구에서는 3.1~3.5 mm 크기의 꽃봉오리에서 채취한 소포자의 배양 초기에 열처리를 하지 않는 대조구와 32.5℃에서 1~5 일간 처리 후 초기분열 및 배발생 양상을 관찰하였다. 배양 초기에 열처리를 하지 않는 대조구(25℃ 배양)에서는 배양 1일 후 소포자의 팽윤현상은 관찰되었으나 이후의 세포분열 및 배발생 과정이 관찰되지 않았다. 그러나 32.5℃에서 열처리를 한 모든 처리구에서 배발생이 관찰되어 배양초기의 열처리에 의해 세포분열 및 배발생이 유도됨을 확인하였다. 열처리 기간에 따른 배발생은 2일 처리구에서 배지 1 mL당 약 374개의 배가 발생하여 가장 많은 소포자배가 발생하였고, 열처리 기간이 3일 이상 경과하면 배발생이 급격하게 감소함을 확인할 수 있었다(Table 2). Takahata & Keller(1991)는 *B. oleracea* L.의 소포자 배양 시 32.5℃에서 1일간 열처리하였을 때 배발생에 가장 효율적이라 하였

**Table 2.** Effect of heat treatment (32.5°C) duration and culture density on microspore embryogenesis in ‘Tammiyuchae’.

Heat treatment duration (day)	Microspore density (ea/mL)	No. of embryos per ml media (±SD)
0	1×10 <sup>4</sup>	-
	5×10 <sup>4</sup>	-
	1×10 <sup>5</sup>	-
	5×10 <sup>5</sup>	-
1	1×10 <sup>4</sup>	57.7 ± 18.2
	5×10 <sup>4</sup>	173.3 ± 49.6
	1×10 <sup>5</sup>	119.0 ± 15.1
	5×10 <sup>5</sup>	33.7 ± 5.1
2	1×10 <sup>4</sup>	50.0 ± 15.1
	5×10 <sup>4</sup>	373.7 ± 67.1
	1×10 <sup>5</sup>	179.3 ± 22.0
	5×10 <sup>5</sup>	110.7 ± 12.5
3	1×10 <sup>4</sup>	38.7 ± 8.3
	5×10 <sup>4</sup>	116.3 ± 19.9
	1×10 <sup>5</sup>	45.3 ± 16.8
	5×10 <sup>5</sup>	55.0 ± 22.5
5	1×10 <sup>4</sup>	55.3 ± 9.5
	5×10 <sup>4</sup>	86.0 ± 8.9
	1×10 <sup>5</sup>	42.3 ± 5.5
	5×10 <sup>5</sup>	36.0 ± 16.7

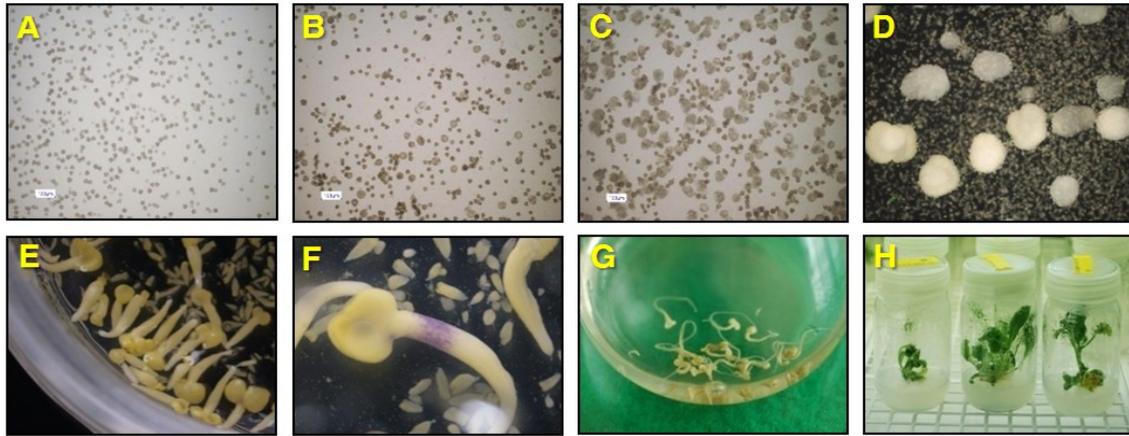
\* Means and standard deviations were calculated from three replicates.

고, Abdollahi *et al.*(2005)은 *B. napus* cv. Global의 경우 30°C에서 18일간 열처리를 하였을 때, Zhang *et al.*(2012)은 *B. rapa* 은 33°C에서 1~2일간 처리하였을 때 배발생에 가장 효율적이라 보고하였다. Binarova *et al.*(1997)은 유채 소포자 배양 시 배발생에 적합한 시기가 아닌 2핵기 말의 소포자를 41°C에서 1~2시간 정도 단기간의 열처리를 함으로써 배발생에 성공하였다는 보고도 있다. 국내 육성품종인 ‘탐미유채’의 경우 열처리 기간은 32.5°C 2일간 처리하는 것이 소포자로부터 배발생 빈도가 가장 높은 것으로 나타나, *Brassica* 속 내의 종 및 품종에 따라 열처리 온도 및 처리기간에 따른 배발생에 차이가 있는 것으로 보인다.

소포자의 초기 배양밀도 역시 소포자의 배발생 빈도에 영향을 주는 것으로 알려지고 있으며, 본 연구에서도 소포자 배양밀도가 1×10<sup>4</sup>개/mL 일 때 보다 5×10<sup>4</sup>개/mL 일 때 최대 7배 정도 배발생의 빈도가 높아졌고, 배양밀도가 1×10<sup>5</sup>개/mL 이상으로 높아지면 배발생률이 감소하였다(Table 3). Abdollahi *et al.*(2005)은 *B. napus* cv. Global의 소포자 배양밀도가 6×10<sup>4</sup>개/mL에서 배발생률이 가장 높다고 보고하

였고, Huang *et al.*(1990)은 *B. napus* cv. Topas 소포자 밀도를 3~4×10<sup>4</sup>개/mL로 배양 시 3~4×10<sup>3</sup>개/mL로 배양할 때 보다 3배 정도 배발생률이 높아지며, 배양밀도가 너무 높아지면(1×10<sup>5</sup>개/mL) 오히려 배 발생을 억제한다고 보고하였고, Kott *et al.*(1992)은 배양밀도가 높아지면 소포자에서 배출되는 독성물질에 의해 배발생이 감소한다고 보고하였다.

‘탐미유채’의 소포자 배양을 통한 전반적인 배발생 과정은 배양 24시간 이내에 소포자의 크기가 커지는 팽윤현상이 나타났다. 첫 번째 세포분열은 배양 2일 전후에 관찰되었으며(Fig. 2B), 이후 활발한 세포분열이 일어나 배양 1주일 후 세포집단이 형성되고(Fig. 2C) 배양 2주일 후에 육안으로 관찰이 가능한 구형배(globular embryo)가 형성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2D). 구형배는 계속되는 세포분열을 통하여 심장형배(heart-shape embryo) 시기와 어뢰형배(torpedo embryo) 시기를 거쳐 배양 4주 후에는 자엽과 하배축 및 뿌리가 발달하여 자엽시기(cotyledonary embryo)의 배로 발달하였다(Fig. 2E). 자엽시기의 배는 더욱 발달하여



**Fig. 2.** Embryogenesis from microspore culture of ‘Tammiyuchae’. A: Freshly isolated microspores, B: First division after 2 days in culture, C: Cell clusters formation after 7 days in culture, D: Globular stage embryos formation after 2 weeks in culture, E: Torpedo and cotyledonary stage embryos formation after 4 weeks in culture, F: Matured embryo, G: Root elongation, H: Regeneration of haploids.

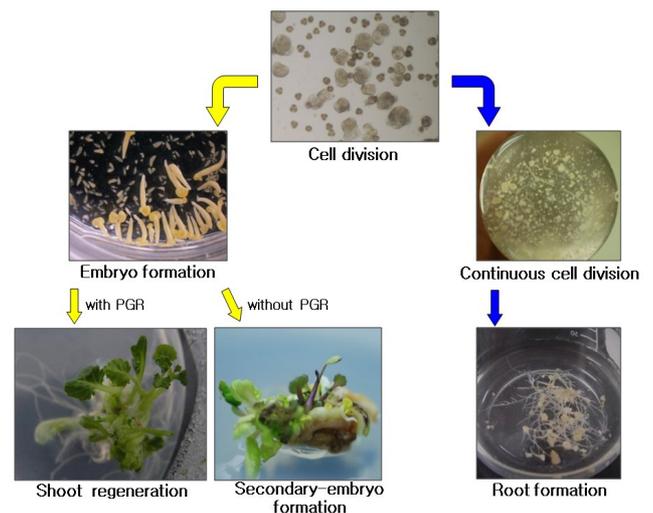
**Table 3.** Effects of plant growth regulators on shoot regeneration from microspore-derived embryos of ‘Tammiyuchae’.

Plant growth regulators (mg · L <sup>-1</sup> )		No. of inoculated embryos	Shoot regeneration frequency (%)	No. of shoots per explant
NAA	BA			
0	0	60	33.3	1.7 ± 0.3
0.1	0.5	60	63.3	3.8 ± 0.7
	1	60	81.7	3.6 ± 0.9
	2	60	76.7	4.3 ± 1.2
0.5	0.5	60	73.3	3.9 ± 0.7
	1	60	93.3	6.6 ± 0.5
	2	60	78.3	5.3 ± 1.1

\* Means and standard deviations were calculated from three replicates.

하배측에 보라색의 안토시아닌이 축적되면서 자엽이 양쪽으로 벌어져 완전히 성숙되었으며(Fig. 2F), 이후 동일한 액체배지가 들어 있는 삼각플라스크에 현탁배양하면 뿌리가 신장되면서 식물체로의 발달이 가능하였다.

한편, 소포자로부터 최초의 세포분열 후 계속되는 분열에 의해 대부분은 정상적인 배발생이 진행되었으나, 일부의 세포는 소포자배를 형성하지 못하고 부정형의 캘러스가 형성되며, 이를 1 mg · L<sup>-1</sup> NAA와 0.05 mg · L<sup>-1</sup> BA가 첨가된 NLN 배지에서 현탁배양하면 부정근만 발생하였다. 이는 배양 초기에 소포자로부터 분열이 되어 발생한 세포들이 배발생으로 진행되기에는 세포의 활력이 부족하여 비배발생(non-embryogenesis) 과정을 거쳐 캘러스가 형성되며, 배지 내에 첨가된 성장조절제의 영향으로 부정근이 발생하는 것으로 생각되었으나(Fig. 3), 비배발생과정이 발생하는 정확한 요인 구명에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.



**Fig. 3.** Different regeneration pathway in microspore culture of ‘Tammiyuchae’. PGR: Plant growth regulator.

### 식물체 재분화 및 순화

배발생을 통해 형성된 소포자배로부터 식물체의 재분화를 위해 NAA와 BA가 농도별로 단독 또는 조합 첨가된 MS 고체배지(3% suc.)에 치상, 배양한 결과, 성장조절제가 첨가되지 않은 처리구에서는 식물체로의 재분화율이 낮을 뿐만 아니라 캘러스의 형성과 함께 다수의 2차배(secondary embryo) 발달이 관찰되었다. 한편, NAA와 BA 등의 성장조절제가 첨가된 처리구에서는 재분화율이 2배 이상 증가되었으며 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 1 mg·L<sup>-1</sup> BA가 첨가된 MS고체배지에서 가장 높은 재분화율을 나타내었다(Table 3). Loh *et al.*(1983)은 *B. napus* ssp. *oleifera*의 반수체배를 호르몬이 없는 MS 배지에서 배양하면 비정상적인 성장과 함께 반수체배의 표면에서 계속적으로 이차배의 형성이 발생하였으며 이를 해결하기 위해 IAA(indole-3-acetic acid)과 kinetin을 첨가하여 배양함으로써 정상적인 반수체 식물체를 생산할 수 있었다고 보고하였고, Wan *et al.*(2011)은 BA, NAA 및 GA<sup>3</sup>가 첨가된 MS배지에서 식물체의 재분화에 성공하였다고 보고하여, 소포자배로부터 식물체로의 재분화에는 적합한 성장조절물질 첨가 배양이 필요한 것으로 생각 되었다.

재분화된 식물체는 뿌리를 유도하기 위하여 호르몬이 첨가되지 않은 MS고체배지를 넣은 유리 배양병으로 옮겨 배양하였으며, 배양 2~3주 후 뿌리가 형성되면 배양병에서 꺼낸 후 흐르는 물에 식물체를 깨끗하게 씻은 식물재배용 상토를 넣은 플라스틱 포트에 이식하고 습도를 높게 유지하면서 순화하였다.

### 적 요

국내 육성 유채 품종의 소포자 배양을 통한 효율적인 소포자배 생산법의 확립을 위해 ‘탐미유채’를 대상으로 소포자 배양 시 적당한 꽃봉오리의 크기, 고온처리시간, 배양밀도, 기내 증식조건 등의 배양조건을 구명하고자 실시한 결과, 소포자배 발생은 1핵기말과 2핵기 초기 상태의 소포자가 포함된 3.0~3.5 mm 크기의 꽃봉오리에서 채취한 소포자에서 배발생률이 가장 높았으며, 배지 1 mL 당 약 388개의 소포자 배가 발생하였다. 배양 초기에 32.5°C에서 2일간 열처리하였을 때 배발생률이 가장 높았다. 소포자의 배양밀도에 따른 배발생은 5×10<sup>4</sup>개/mL일 때 가장 높았으며, 배양 밀도가 더 이상 높아지면 배발생을 억제하였다. 발생한 소포자배는 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 1 mg·L<sup>-1</sup> BA가 첨가된 MS 고체배지에 치상하여 배양하면 정상적인 신초로 재분화되었고, 발달한 신초를 절취하여 식물성장 조절제가 첨가되지 않은 MS고체배지에서 배양하면 뿌리가 발달하여 정상적인 식물체로 성장하였다.

### 인용문헌

- Abdollahi, M. R., A. Moieni, P. Haddadi, and M. Jalali Javaran. 2005. Effects of heat shock and culture density on the embryo induction in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L. cv. Global. *Pakistan J. of Biological Sciences* 8 : 89-91.
- 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.
- Binarova, P., G. Hause, V. Cenklova, J. H. G. Cordewener, and M. M. van Lookeren Campagne. 1997. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sexual Plant Reproduction* 10 : 200-208.
- Chuong, P. V., C. Deslauriers, L. S. Kott, and W. D. Beversdorf. 1988. Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus*. *Can. J. Bot.* 66 : 1653-1657.
- 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.
- Ferrie, A. M. R. and W. A. Keller. 1995. Microspore culture for haploid plant production. In : Gamborg O. L., Phillips G. C. (eds) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: fundamental methods*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 155-164.
- 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.
- Gu, H. H., P. Hagberg, and W. J. Zhou. 2004. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regulation* 42 : 137-143.
- Huang B., S. Bird, R. Kemble, D. Simmonds, W. Keller, and B. Miki. 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.
- Jang, Y. S., I. H. Choi, Y. B. Oh, S. Y. Cho, D. H. Chong, and H. C. Oh. 1997. New early-maturing, flower of large size and the use of sightseeing rapeseed variety “Tammiyuchae”. *Kor. J. Breed.* 29 : 507-507.
- 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 : 480-485.
- Kim, K. S., M. Y. Li, Y. S. Jang, Y. J. Park, and J. K. Bang. 2008. Production of haploids from proton ion and gamma-ray irradiation treated M<sub>2</sub> generation of isolated microspores in *Brassica napus* L. ssp. *oleifera*. *Korean J. Crop Sci.* 53 : 16-50-155.

- Lo, K. H. and K. P. Paules. 1992. Plant growth environment effects on rapeseed microspore development and culture. *Plant Physiol.* 99 : 468-472.
- Loh, C. S., D. S. Ingram, and D. E. Hanke. 1983. Cytokinins and the regeneration of plantlets from secondary embryoids of winter oilseed rape, *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *New Phytologist* 95 : 349-358.
- 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 indicata* L. I. The production of vegetative buds. *Planta.* 72 : 355-370.
- Takahata, Y. and W. A. Keller. 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Science*, 74 : 235-242.
- 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.
- Wan, G. L., M. S. Naeem, X. X. Geng, L. Xu, B. Li, G. Jilani, and W. J. Zhou. 2011. Optimization of microspore embryogenesis and plant regeneration protocols for *Brassica napus*. *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 13, No. 183-88.
- Zhang, Y., A. Wang, Y. Liu, Y. Wang, and H. Feng. 2012. Improved production of doubled haploids in *Brassica rapa* through microspore culture. *Plant Breeding* 131 : 164-169.