

잔디의 약배양에 있어서 살정제 처리에 의한 Larger-sized Pollen의 발생빈도 증가 및 캘러스 유도

조문수^{1*}, 정의동¹, 예병쾌¹, 안병준², 최준수²

¹대구대학교 자연자원대학 원예학과, ²단국대학교 생명자원과학부

Increase of Larger-sized Pollen Number by Gametocide and Callus Induction in Anther Culture of *Zoysia japonica* Steud.

Moon-Soo Cho^{1*}, Ue-Dong Juang¹, Byong-Kwea Ye¹, Byung-Joon Ahn², Joon-Soo Choi²

¹Department of Horticulture, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

²Division of Bioresources Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

ABSTRACT In this study we investigated the effect of gametocides on the number of larger-sized pollen in anther, and also induced callus from the anther culture of *Zoysia japonica* Steud. Before culturing, we have observed pollens in anther through fluorescence and electron microscopes to know pollen dimorphism. There were two types of pollens observed. One type (30-36 μm in diameter) consisted of vacuolated, larger-sized pollens and the other (15-20 μm in diameter) smaller-sized ones with dense cytoplasm and plenty of amyloplasts. Within few hours, all the smaller-sized pollens were dead, while larger-sized ones were viable for one or two days. To induct larger-sized pollens, various gametocides were leaf-sprayed on three booting stages cultured under 40°C/15°C (day/night) before anther culturing. Number of these larger pollens were few (less than 1%) in anther without spraying gametocides. GA₃ increased the number of larger-sized pollens when applied at mid-booting stage. GA₃ with 50 mg/L treatment caused the highest percentage (25.4%) of the larger-sized pollen. Anthers with GA₃ treatment were only produced calli on AA medium (modified B₅ + 8.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L kinetin), but callus formation was quite low (less than 1%).

Key words: Booting stage, GA₃, larger sized pollen

서 론

들잔디는 우리나라에서 광범위하게 자생하고 있는 다년생 초본식물로 척박한 토양에서도 잘 자라기 때문에 정원, 공원, 경기장, 골프장 등 거의 모든 장소에서 이용되고 있고 더욱이 사방공사용은 물론 국토 녹화 및 미화에도 널리 이용되는 대단히 유용한 피복식물이다. 잔디에 있어서 특정 유전형질을 지닌 순계를 분리하는 데는 주로 전통적인 육종 방법에 의존

하고 있으나, 이러한 육종방법은 특정한 형질을 고정시켜 새로운 품종을 육성하는데 6~7년의 장기간이 소요되며 순계를 얻기 위해서는 계속해서 자식을 시켜야 하는데 이는 자식 약세를 초래하는 결과를 낳게 된다. 또한 이에 따른 많은 노력과 투자를 요하고 있다. 그러나 약배양기법을 이용하면 단 1~2세대 만에 순계를 얻을 수 있어 육성년한을 크게 단축시킬 수 있고 약배양체로부터 얻은 순계는 유전적으로 매우 안정되어 있기 때문에 초기 세대에 형질조합 능력을 결정할 수가 있는 이점이 있다 (Gunn and Day 1986; Nitzche and Wenzel 1977). 그러나 이러한 이점을 가지고 있음에도 불구하고 국내외 있어서 잔디의 경우, 품종 육성 차원에서 단기간

*Corresponding author Tel 053-850-6714 Fax 053-850-6719
E-mail mscho@taegu.ac.kr

내에 순계를 얻기 위한 약배양기법의 이용은 거의 시도되지 않고 있으며 잔디 약배양에 관한 연구보고 또한 전무한 실정이다. 잔디의 약배양은 다른 작물의 약배양에 비하여 매우 어려운 것으로 되어 있어 품종 육성면에 이용되지 못하고 있는 것으로 보인다. 약배양이 잘 안 되는 이유는 식물의 약 안에 들어 있는 많은 화분 중에서 극히 소수의 화분만이 캘러스 형성 및 식물체로 분화된다는 사실이다. 따라서 약배양을 이용하여 품종을 육성하기 위해서는 약 안의 화분의 상태를 정확히 파악하여 캘러스 발생 효율을 높이는 것이 급선무라 할 수 있다.

화분에 dimorphism 현상이 있다는 사실은 오래 전부터 보고되었다 (Sunderland and Dunwell 1977). 화분의 dimorphism 현상이란 화분의 형태나 크기가 2개로 확연히 구분되는 것을 말한다. 하나는 배우체로 분화되고 다른 하나 (배발생화분)는 배양에 반응해서 조세포로 전환된다는 사실이다. 이것이 약배양체로부터 캘러스 형성에 밀접한 관계가 있다는 사실이 같은 화분과식물인 벼와 다른 작물의 화분에서 증명되어 이 부문에 많은 연구가 집중되고 있다 (Chen et al. 1980; Cho and Zapata 1989; Dale 1975; Horner and Steer 1978). 과거에는 배지의 조성물질을 달리하여 작물의 약배양 효율을 높이려 하였으나 배지조성은 부가적인 요인으로 단순히 존재하는 배발생화분들의 반응정도에 기여한다고 보고하였다 (Rashid and Reinert 1983). 문제의 배발생화분은 불임성 화분인 것으로 추정되며 발생빈도수는 배양 재료로 사용될 식물체의 환경 조건에 크게 영향을 받는다는 사실이 알려졌다 (Dunwell 1985; Dunwell et al. 1985; Heberle-Bors 1985; Maheshwary et al. 1980; Werniche et al. 1978). 이러한 결과는 약배양으로부터 배발생 증가를 유도하여 식물체로 쉽게 분화시킴으로써 품종 육성에 이용할 수 있는 가능성을 부각시켰다.

따라서 본 연구는 약배양기법을 이용하여 잔디의 유용한 육성재료를 생산하기 위한 기초실험으로서 지금까지 전혀 이루어지지 않던 약배양의 효율을 높이기 위하여 배발생화분으로 추정되는 크기가 큰 화분 (larger-sized pollen)의 존재 여부를 확인하고 살정제를 처리함으로써 그 빈도수를 증가시켜 캘러스 형성을 성공적으로 유도하고자 수행하였다.

재료 및 방법

화분의 dimorphism 및 생존력 검정

화분의 생존력을 검정하기 위하여 10~20 mL의 B₅ (Gamborg et al. 1968) 액체배지가 들어 있는 50 mL flask에 mid booting stage (약 2 cm 길이의 panicle)에 있는 30여 개의 약과 작은 자석막대를 넣은 다음 약 30분 동안 자석교반기 위에서 저온 다음 추출물을 나일론 메시 (64 μm pore size)로 거른 후 100 xg에서 5분간 원심분리시켰다. Pasteur pipet으로

로 상등액을 조심스럽게 버린 후, pellet에 7 mL 정도의 B₅ 액체배지를 넣고 100 xg에서 5분간 원심분리시켰다. Pasteur pipet으로 상등액을 조심스럽게 버린 후, pellet에 3 mL의 mannitol-percoll 용액을 넣고 450 xg에서 5~10분간 원심분리시켰다. 순수한 화분만이 원심분리관 맨 위에 층을 형성하는데 이것을 Pasteur pipet으로 걸러 새로운 원심분리관에 넣고 7 mL 정도의 B₅ 액체배지를 넣고 100 xg에서 5분간 원심분리시켰다. Pasteur pipet으로 상등액을 조심스럽게 버린 후 광학현미경을 이용하여 화분의 dimorphism을 관찰하였다. Fluorescein diacetate (FDA : 150 mg fluorescein diacetate/50 mL acetone)용액 1방울과 화분농축 용액 1방울을 섞어 형광현미경 하에서 화분의 생존력을 관찰하였다 (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison 1970).

화분의 해부학적 관찰

Percoll density gradient centrifugation에서 분리된 화분을 100 xg에서 원심분리 후 pellet (pollens)을 agar로 굳힌 다음 실온에서 2% potassium phosphotungstic acid (pH 6.0)로 direct negative 염색한 후 Karnovsky 고정액과 osmic acid에 이중 고정하여 alcohol 시리즈 및 propyleneoxide로 탈수시켜 spur 수지에 표리, 초박 절단한 것을 uranyl acetic lead citrate 이중 염색하여 Zeiss 109 전자현미경으로 화분의 피하구조를 관찰하였다 (Rashid et al. 1981; Sangwan and Sangwan-Norreeel 1987).

Panicle 발육 단계에 따른 larger-sized pollen에 대한 살정제 처리효과

Larger-sized pollen의 빈도를 증가시키기 위하여 여러 가지 살정제 종류 및 농도를 달리하여 이삭이 안보일 때 (early booting stage - 약 1 cm 길이의 panicle) 1회, 이삭이 안보일 때 (early and mid booting stage - 약 1.5 cm 길이의 panicle) 2회, 이삭이 약간 보일 때 (mid booting stage - 약 2 cm 길이의 panicle) 1회 엽면 살포하였다. 사용된 살정제는 GA₃를 50, 100, 200 mg/L, TIBA를 25, 50, 100 mg/L 그리고 Ethrel를 2000, 4000, 8000 mg/L로 하여 처리하였다. 각각의 stage에 있는 panicle을 cold fixative (100% alcohol : glacial acetic acid (3 : 1 v/v)에서 고정시키고 냉장 상태에서 overnight시켰다. 고정시킨 panicle에서 약을 1~2개 적출하여 현미경 glass 위에 올려놓고 acetocarmine 염색약을 한 방울 떨어뜨린 다음 약을 짓눌러 화분을 적출하였다. 약 1분 후에 45% acetic acid 한 방울을 떨어뜨린 다음 cover slip으로 덮고 현미경으로 소포자의 구조 및 형태를 조사하였다 (Giles and Prakash 1987). 용액을 hematocytometer에 떨어뜨려 광학현미경하에서 아래와 같은 방법으로 larger-sized pollen의 빈도를 조사하였다.
% of larger-sized pollen = No. of larger-sized pollens/No. of total pollens × 100

약배양

우리나라에 널리 보급되고 있는 *Zoysia japonica* Steud를 수집, 본 대학 온실에서 관리해 오면서 본 실험의 약배양 재료로 이용하였다. GA₃ 0, 50 mg/L를 처리 한 mid booting stage (약 2 cm 길이의 panicle)에 있는 개화하기 전 꽃 봉우리 상태의 화서를 채취하여 흐르는 물에 비누를 이용하여 깨끗이 세척한 다음 소화를 마쳐서 2%의 sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균한 다음 멸균수로 3번 충분히 세척한 후 해부현미경 하에서 약을 절취하여 배양재료로 사용하였다. 약배양의 기본배지로는 B₅를 변형시킨 AA배지 - (NH₄)₂SO₄를 26.8 g/L, CaCl₂를 15 g/L, H₃BO₃를 0.3 g/L, ZnSO₄를 0.2 g/L, FeSO₄를 2.78 g/L, myo-inositol을 100 mg/L로 변형 - 에 8 g/L agar와 30 g/L sucrose를 첨가하여 반고체배지로 조제하였으며 pH는 5.6으로 조절하였다. 120°C, 1.2기압에서 15분간 살균하였다. 캘러스를 유도하기 위해서 0.2 mg/L kinetin에 1, 2, 4, 8 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지를 조제하여 직경 5.5 cm의 멸균된 일회용 플라스틱 petri-dish에 분주하였다. 캘러스를 유지하기 위해서 약배양체를 온도 25±2°C, 연속 암상태의 배양조건 하에서 배양하였다.

결과 및 고찰

화분의 dimorphism, 생존력 검정 및 해부학적 관찰

약 안의 화분을 절취하여 화분의 dimorphism과 생존력 그리고 해부학적으로 구조 및 형태를 조사하였다 (Figure 1). 잔디의 약을 통하여 화분의 dimorphism 현상을 확인할 수 있었다 (Figure 1A). 하나는 크기에 있어서 상대적으로 크며 (직경 30~36 μm) 연하게 염색되었고 크기가 작은 다른 화분 (직경 15~20 μm)은 진하게 염색되었다. Figure 1B는 약으로부터 적출된 크기가 큰 화분이며 Figure 1C는 같은 화분의 생존력을 나타낸 것이다. 크기가 상대적으로 작은 화분 (smaller-sized pollen)은 약 8시간 안에 고사하였으나 크기가 큰 화분 (larger-sized pollen)은 오랫동안 형광을 발하는 것으로 보아 살아있는 것으로 관찰되었다. 잔디의 약에서 크기가 큰 화분은 존재하고 있으나 그 수에 있어서는 약 1% 이하로 극히 적은 것으로 나타났다. 본 실험실에서 수십 차례에 걸쳐 10,000 개 이상의 약을 배양하였으나 단 한 개의 약에서조차 캘러스를 얻지 못하였다. 그 이유는 위에서 언급한 것처럼 조포체로 전환될 수 있는 화분의 수가 적기 때문이 아닌가 생각된다. Cho 등 (1988, 1990)은 화분과식물인 벼에서 크기가 큰 화분이 작은 화분 보다 생존력이 길었으며 크기가 큰 화분만이 분열하여 캘러스를 형성한다고 보고한바 있다. 전자현미경을 통하여 크기가 큰 화분과 크기가 작은 화분의 피하구조 차이를 알아보았다 (Figures 1D, 1E). 관찰된 화분 중에서 크기가

큰 화분은 상당히 액포화 되어 있고 연하게 염색된 세포질로 구성되어 있는 것을 알 수 있었다 (Figure 1D). 크기가 상대적으로 작은 화분은 amyloplast가 많이 산재해 있는 것으로 나타났다 (Figure 1E). 보통 proplastid를 많이 내포하고 있는 액포화된 화분은 배양시 분열하여 재분화가 잘 일어나 amyloplast가 많이 내포되어 있는 화분은 재분화가 일어나지 않는다고 보고된 바 있다 (Sangwan and Sangwan-Norreel 1987). 엽록체가 풍부한 잎이나 줄기의 조직에는 proplastid가 많아 배양하면 재분화가 쉽게 이루어지나 amyloplast가 풍부한 조직인 배유나 괴근 등을 조직배양 할 경우 재분화가 잘 이루어지지 않는 결과와 유사한 것으로 사료된다. 조사된 잔디의 화분에는 amyloplast가 많이 들어 있는 화분의 수가 약 안에 대부분을 차지하는 것으로 나타났다. 이는 화분의 발육정도가 상당히 진행되었음을 의미하며 이것은 지금까지 화분의 배양 반응 정도가 상당히 느리거나 전무한 것에 대한 이유가 아닌가 사료된다. 본 실험에서는 액포화된 화분에서 proplastid의 존재여부를 명확하게 밝힐 수는 없었으나 화분의 액포화와 proplastid의 존재여부는 조포체로 전환될 수 있는 중요한 단서로 이용할 수가 있을 것이다.

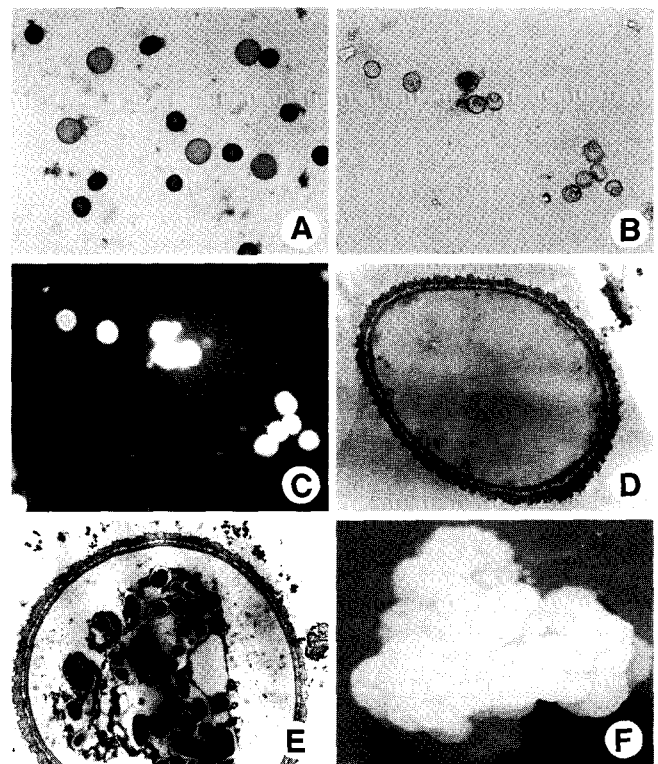


Figure 1. A, Freshly isolated pollens indicating two types (x400). One shows a large size and light staining. The other shows a small and dark staining; B, Microscopic view of larger-sized pollens (x200); C, Larger pollens under fluorescence microscopy with viability (x200); D, Electron micrograph of vacuolated, larger-sized pollen (approx. x55,000); E, Electron micrograph of smaller-sized pollen showing numerous amyloplasts (black circles) (approx. x55,000); F, Callus showing yellowish and compact structures.

Larger-sized pollen의 증가를 위한 살정제 효과

처리 후 7일째 되는 날에 크기가 큰 화분의 빈도를 조사하였다 (Figures 2, 3, 4). 광학현미경하에서 크기가 큰 화분의 수를 전체 화분수로 나누어 백분율로 환산하여 larger-sized pollen의 빈도를 나타내었다. GA₃의 경우 mid booting stage에서 50 mg/L의 농도로 처리하였을 때 larger-sized pollen의 빈도가 25.4%로 가장 높게 나타났다. Early booting stage에서는 GA₃의 처리농도가 높을수록 larger-sized pollen의 빈도가 높게 나타났으나 early and mid booting stage와 mid booting stage에서는 처리농도가 낮을수록 빈도수가 높게 나타났다 (Figure 2). 200 mg/L의 높은 농도는 larger-sized pollen의 빈도를 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 모든 GA₃ 처리는 대조구보다 larger-sized pollen의 증가에 양호한 것으로 나타났다. TIBA의 경우, early booting stage와 mid booting stage에서는 25와 100 mg/L에서 larger-sized pollen의 빈도가 약간

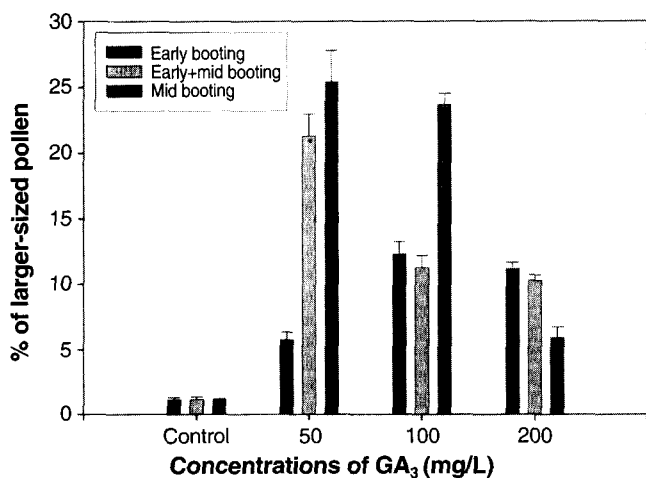


Figure 2. Effects of GA₃ on the frequency (%) of larger-sized pollen in the anther. Data were evaluated at 7 day after GA₃ treatment.

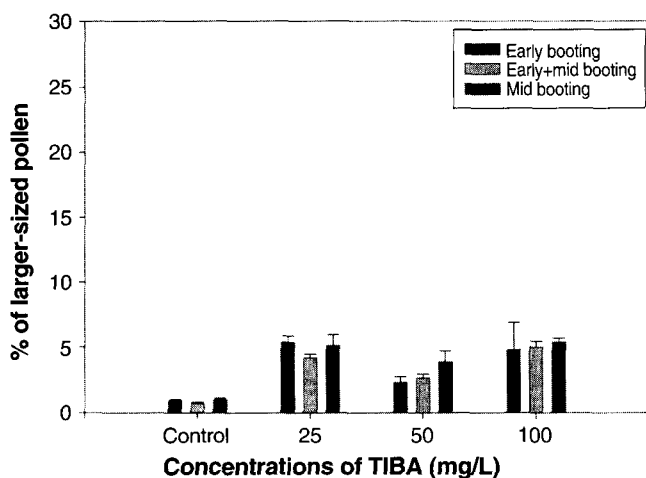


Figure 3. Effects of TIBA on the frequency (%) of larger-sized pollen in the anther. Data were evaluated at 7 day after TIBA treatment.

높게 나타났으나 화분 발육단계에 따른 모든 처리농도는 larger-sized pollen의 증가에 크게 영향을 미치지 못하였다 (Figure 3). Ethrel의 경우, early booting stage에서는 처리농도가 높을수록, early and mid booting stage에서는 처리농도가 낮을수록 그리고 mid booting stage에서는 농도에 관계없이 larger-sized pollen의 증가에 영향을 미치는 것으로 보였다 (Figure 4). Ethrel 처리는 early booting stage에서만 TIBA보다는 약간 양호하게 나타났으나 그 외 발육단계에서는 별 차이가 없었다. TIBA와 Ethrel의 경우 처리농도와 처리횟수는 GA₃ 처리보다 larger-sized pollen의 증가에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다. 처리한 살정제 중에서 GA₃가 larger-sized pollen 증가에 가장 효과적인 것으로 나타났으며 처리횟수보다는 처리농도가 중요한 요인으로 보였다.

보통 작물에서 응성불임을 유도하기 위해서 살정제를 살포한 경우가 많이 있다 (Heberle-Bors and Odenbach 1985; Jan and Rowell 1981; Perez et al. 1973). GA₃, Ethrel 처리는 벼와 옥수수에서 약 60% 이상의 화분 불임을 보인다고 보고하였다. Larger-sized pollen이 불임성화분을 측정하는 염색 방법을 통하여 불임성화분으로 확인된 바, larger-sized pollen을 증가시키기 위하여 살정제를 이용하였다. 불임성화분의 배발생에 관한 정확한 기작은 아직 밝혀진 바 없으며 자연상태에서 일반적으로 재배되는 양호한 환경보다는 나쁜 재배환경에서 이러한 불임성화분이 증가된다는 보고가 있다 (Heberle-Bors 1985). 불임성화분을 유기하기 위한 살정제 처리는 약배양 효율을 높일 수 있는 방법으로 사료된다.

Callus 유기

잔디의 약배양체로부터 캘러스를 유기하기 위하여 잔디가 성장하기 시작할 때부터 주간에는 약 40°C의 고온 조건에서 재배하였다. 야온은 15°C 이상이 되도록 유지하였다. Mid booting

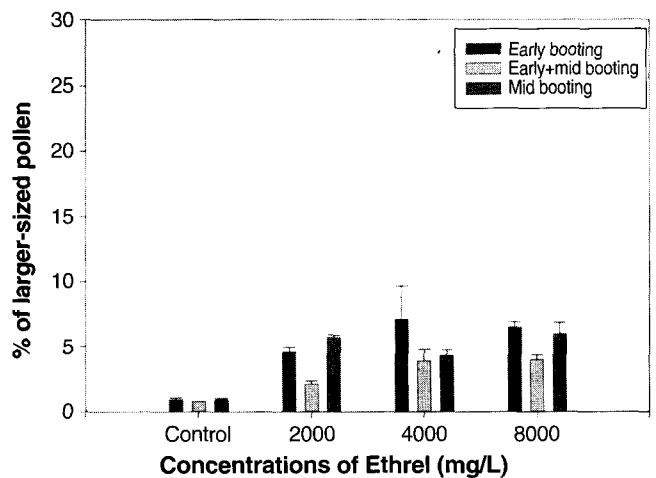


Figure 4. Effects of Ethrel on the frequency (%) of larger-sized pollen in the anther. Data were evaluated at 7 day after Ethrel treatment.

stage에서 GA₃ 50 mg/L + 0.1 ml/L Tween 20을 충분히 염면에 살포하였다. 배양 결과 약의 배양 반응은 매우 느렸으며 배양 약 5개월 후 AA기본고체배지+8.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L kinetin 배지에서 만 캘러스가 형성되기 시작하였다 (Figure 1F). 그러나 캘러스 형성률은 약 1.0%로 매우 저조하였다 (data 미제시). 그 동안 수십 차례에 걸쳐 잔디의 약배양으로부터 캘러스가 전혀 형성되지 않았으나 GA₃ 처리에서 캘러스를 유기시킬 수가 있었다. 자료는 제시하지 못하였지만 위의 결과로 보아 많은 larger-sized pollen에서 캘러스가 유기되지 않았나 생각된다. 8 mg/L 2,4-D 농도에서 만 캘러스가 형성된 것으로 보아 그 이상의 2,4-D 농도가 캘러스 형성률을 증가시키는 데 효과가 있는 것으로 판단되며 2,4-D 농도에 따른 배지조성에 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다. 형성된 캘러스를 작게 분리하여 증식하였으며 식물체로 재생시키기 위하여 분화배지 (AA기본고체배지+2.0 mg/L kinetin + 0.2 mg/L NAA)로 옮겨 배양하였으나 식물체분화는 이루어지지 않았다.

적 요

잔디에 있어서 larger-sized pollen의 발생빈도에 대한 살정제 처리효과 및 캘러스 유기 조건을 조사하기 위하여 실험을 수행하였다. 약 안의 화분을 절취하여 화분의 생존력 및 dimorphism 현상을 조사한 결과, 2가지 화분의 형태가 관찰되었다. 하나는 크기에 있어서 상대적으로 크며 (직경 30~36 μm) 연하게 염색되었고 크기가 작은 다른 화분 (직경 15~20 μm)은 진하게 염색되었으며 amyloplast가 많이 산재해 있는 것으로 나타났다. 잔디의 약에서 배발생화분으로 추정되는 크기가 큰 화분 (larger-sized pollen)은 존재하고 있으나 그 수에 있어서는 약 1% 이하로 극히 적은 것으로 나타났다. 크기가 큰 화분의 발생빈도수를 높이기 위하여 약 40°C의 주간과 15°C 이상의 야간 온도 조건에서 재배된 잔디의 mid booting stage에서 GA₃ 50 mg/L + 0.1 ml/L Tween 20을 충분히 염면에 살포하였다. GA₃의 경우 mid booting stage에서 50 mg/L의 농도로 처리하였을 때 크기가 큰 화분의 빈도가 25.4%로 가장 높게 나타났다. 위의 조건에서 처리된 약에서만 AA기본고체배지+8.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L kinetin 배지에서 캘러스가 형성되었으나 캘러스 형성률은 약 1.0%로 매우 저조한 것으로 나타났다.

사사 - 본 연구는 1997~2002년도 농림기술개발사업의 첨단 기술개발에 의한 연구결과이다.

인용문헌

- Chen T, Wang R, Tian W, Zuo A, Zheng S, Liu D, Zhang G (1980) Studies on pollen culture in vitro and induction of plantlets in *Oryza sativa* subsp. Keng. Acta genet Sin 7: 46-53
- Cho MS, Zapata FJ (1988) Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L. taipei 309). Plant Sci 58: 239-244
- Cho MS, Zapata FJ (1990) Plant regeneration from isolated microspore of indica rice. Plant Cell Physiol 31: 881-885
- Dale PJ (1975) Pollen dimorphism and anther culture in baley. Planta 127: 213-220
- Dunwell JM (1985) Embryogenesis from pollen in vitro. In: Zaithin M, Day A, Hollaender A (eds), Academic Press, Orlando, Florida pp 49-76
- Dunwell JM, Cornish M, De Courcel AG (1985) Influence of genotype, plant growth regulator and anther incubation temperature on microspore embryo production in *Brassica napus* spp. oleifera. J Expt Bot 36: 678-689
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50: 151-158
- Giles KL, Prakash J (1987) Pollen: cytology and development. In: International Review of Cytology. vol. 107. Academic Press, Orlando. pp 455
- Gunn RE, Day PR (1986) In vitro culture in plant breeding. In: Withers LA, Anderson PG (eds). Plant Tissue Culture and its Agricultural Application. Butterworths, London. pp 313-336
- Heberle-Bors E (1985) In vitro haploid formation from pollen: a critical review. Theor Appl Genet 71: 361-374
- Heberle-Bors E, Odenbach W (1985) In vitro pollen embryogenesis and cytoplasmic male sterility in *Triticum aestivum*. Z pflanzenzuchtg 95: 14-22
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Tech 45: 115-120
- Homer M, Steer E (1978) Pollen dimorphism-origin and significance in pollen plant formation by anther culture. Ann Bot 42: 763-777
- Jan CC, Rowell PL (1981) Response of wheat tillers at different growing stages to gametocide treatment. Euphytica 30: 501-504
- Maheshwary SC, Taygi AK, Malhotra K (1980) Induction of haploid from pollen grains in angiosperm - the current status. Theor Appl Genet 58: 193-206
- Nitzche W, Wenzel G (1977) Haploids in Plant Breeding. Parey Berlin pp 101
- Perez AT, Chang TT, Beachell HM, Vergara BS, Marciano AP (1973) Induction of male sterility in rice with ethrel and RH-531. Sabrao newsletter. 5: 133-139
- Rashid A, Reinert J (1983) Factors affecting high frequency embryo

- formation in ab initio pollen culture of *Nicotiana*. Protoplasma 105: 161-167
- Rashid A, Siddiqui AW, Reinert J (1981) Ultrastructures of embryogenic pollen of *Nicotiana tabacum* var. Badischer Burley. Protoplasma 107: 375-385
- Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1987) Ultrastructural cytology of plastids in pollen grains of certain androgenic and nonandrogenic plants. Protoplasma 138: 11-22
- Sunderland N, Dunwell JM (1977) Anther and pollen culture. In: Street H E (ed). Plant Tissue and Cell Culture. Blackwell Scientific, Publication, Oxford, pp 223-265
- Werniche W, Harms CT, Lorz H, Thomas E (1978) Selective enrichment of embryogenic microspore populations. Naturwissensch 65: 540-541

(접수일자 2002년 10월 21일, 수리일자 2003년 2월 8일)