브로콜리 화기 구조에 따른 소포자 밀도 및 발달 단계

김수진¹ · 곽정호¹ · 도경란¹ · 나해영^{2*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원, ²목포대학교 원예과학과

Developmental Stage and Density of Microspore by Flower Structure in Broccoli Lines

Su Jin Kim¹, Jung-Ho Kwak¹, Kyung Ran Do¹, and Haeyoung Na^{2*}

¹National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 440-706, Korea

²Major in Horticultural Science, Mokpo National University, Muan 534-729, Korea

Abstract : Microspore-derived embryos (MDE) induction was investigated in 74 broccoli lines. The MDE induction was observed in only 18 broccoli lines. Especially, MDE was produced about 20 per petri dish in 08-8-8 and 08-8-33 lines. The influence of MDE induction was investigated by flower structure and bud size (S, 0.1~0.2; M, 0.2~0.4; L, 0.4~0.6 mm) in 08-8-8 (high MDE induction line) and 08-8-10 (no MDE induction line) lines. There was no difference in structure of flower bud between 08-8-8 and 08-8-10 lines, but M size flower bud has much longer stigma than petal in only 08-8-8 line. There was no observation of microspore at S size flower bud of 08-8-8 and 08-8-10 lines. The No. of MDE was correlated with the flower bud size. Microspore density of anther was much higher in the 08-8-8 than in the 08-8-10 line. Most of microspores in anther were at late uninucleate stage in 08-8-8 (91.3%) and in 08-8-10 line (45.7%).

Keywords : Broccoli, Density, Developmental stage, Flower structure, Microspore

서 언

소포자 유래 배는 약 내의 소포자가 본래의 분화 발달 방향을 바꾸어 배우체인 화분으로 발달하는 대신 조포제로 발달한 것이다(Aionesei et al. 2005). 따라서 이를 임의로 생산하면 식물 세포의 분화 기작을 연구하기 위한 분자 생물학적 기초 재료나 반수체 육종에 유용하게 이용할 수 있다(Ali et al. 2008, Olmedilla 2010, Aionesei et al. 2005). 그러나 벼, 담배, 유채 등 몇 종의 식물들을 제외한 대부분의 식물에서 소포자 유래 배의 발생 비율이 높지 못할 뿐 아니라 소포자 유래 배 발생이 가능한 종 내에서도 품종 및 계통 간에 발생의 차이가 심하여 육종 재료로 사용하기에 극히 제한적이다.

소포자 배양 시 배의 발생은 모식물의 생육 조건, 소포자의 분리 시기 및 활력, 전 처리 조건, 배지 조성, 배양 조건 등에

의해 크게 영향을 받는다(Barro et al. 2003, Gu et al. 2003, Lionneton et al. 2001, Phippen 1990, Weber et al. 2005, Zhou et al. 2002). 일부 작물에서 소포자 분리 시기, 전처리 조건 그리고 배지 조성에 관한 연구는 어느 정도 진행되었으나 종 내에서 소포자 유래 배 발생이 가능한 품종 및 계통을 선별하는 정도의 연구만이 진행되어 소포자 유래 배 발생이 불가능한 품종이나 계통에 대해 그 원인을 아직 밝혀내지 못하고 있는 실정이다.

일반적으로 여러 식물에서 소포자 유래 배 발생에 적합한 소포자의 발육 단계가 1핵성 말기 또는 2핵성 초기로 이 시기에 소포자를 분리하는 것이 적합하다는 많은 보고가 있었다(Barro and Martin 1999, Telmer et al. 1992, Wong et al. 1996, Zaki and Dickinson 1990). 그러나 종이나 품종 및 계통 간에도 많은 차이가 나타나며 소포자의 발육 단계를 현미경 검경으로 확인하는 것은 매우 번거로운 일이다. 따라서 이러한 문제점을 보완하기 위해서는 배 발생이 가능한 소포자를 포함하고 있는 화뢰의 크기를 정확하게 선별하고 동정하

*Corresponding author (E-mail: somerze@mokpo.ac.kr, Tel: +82-61-450-2371, Fax: +82-61-452-0140)

(Received on December 28, 2012. Revised on February 27, 2013.
Accepted on March 6, 2013.)

는 것이 필요하다. 현재까지는 화뢰의 크기, 약과 주두의 비율에 따른 기준으로 소포자 분리 시기를 결정하였으나 이는 소수 품종에만 적용 가능하였다(Chun et al. 2011, Na et al. 2011a, 2011b). 소포자 유래 배 발생이 되지 않은 품종들의 근본적인 원인을 구명하기 위해서는 먼저 각각 소포자 분리하는 단계를 구명해야 하며 또한 화뢰 내에 포함되어 있는 소포자 유래 배의 발육 상태를 조사하는 것도 필요할 것으로 판단된다. 따라서 품종 및 계통과 생육 시기에 따른 화뢰의 크기 및 구조와 소포자의 발육 단계의 관계를 명확히 밝히는 연구가 필요하다. 소포자 유래 배 발생을 위한 재료로 사용되는 화뢰를 해부학적으로 관찰하여 소포자 분리 단계를 구명한다면 배추과 작물 외에 다른 작물에도 소포자 유래 배를 이용한 반수체 육종이 가능해질 것이다.

따라서 본 연구는 브로콜리 계통에서 소포자 화기 구조 및 크기에 따른 소포자 밀도와 발달 단계의 상관관계를 조사하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료

실험 재료로 이용한 브로콜리는 수원 소재 농촌진흥청 농업과학특작과학원과 국립농업유전자원센터에서 분양받은 계

통 74여종을 대상으로 하여 실험을 수행하였다. 브로콜리의 계통 정보는 Table 1과 같다.

소포자 유래 배 배양 조건

개화가 시작된 꽃봉오리를 채취하여 선행 연구 결과(Na et al. 2011a, 2011b) 소포자 유래 배 배양을 위해 최적의 조건을 가진 것으로 판단되는 화엽의 길이가 주두의 길이보다 짧은 화뢰만을 선택하여 실험에 사용하였다.

화뢰는 sodium hypochlorite 1% 용액에 15분간 침지한 후 멸균수로 3분씩 3회 세척하여 표면을 살균 처리하였다. 표면이 살균된 시료는 막자 사발에 넣고 13% sucrose가 첨가된 B-5 배지를 조금씩 넣어 부드럽게 간 후 45 μ m 체로 소포자를 걸러내었다. 걸러진 용액을 10 mL씩 시험관에 넣고 1,000 rpm으로 3분간 원심 분리하여 침전물을 남기고 위의 용액을 따라버린 후 13% sucrose가 첨가된 B-5 배지로 세척하여 원심 분리하고 같은 과정을 3회 반복하였다.

세척을 끝낸 후 하나의 화뢰에서 나온 소포자에 소포자 배양용 배지 2.5 mL를 접종한 후 60 $\times$ 15 mm petri dish에 분주하여 parafilm으로 밀봉하였다. 32.5°C로 조절한 생육상에서 24시간 암 배양한 후 온도를 25.0°C로 낮추어 9일 동안 암 배양하였다. 암 배양이 끝난 시료들은 70 rpm의 진탕기에서 10일 정도 배양하였으며 그 후 소포자 유래 배 형성을 관찰하였다.

Table 1. 74 Broccoli lines.

05-8-2	08-8-1	08-F-476	09-6-19	09-FA30	10-8-1
05-8-3	08-8-2		09-6-20	09-FA250	10-8-2
	08-8-3	08-FA-48	09-6-21	09-FA263	
	08-8-5	08-FA-133			10-SA1
	08-8-6	08-FA-145	09-7-22	09-FM,EM133	10-SA11
	08-8-8	08-FA-263	09-7-25		10-SA12
	08-8-9	08-FA-307	09-7-26		10-SA97
	08-8-10	08-FA-315	09-7-27		10-SA110
	08-8-11	08-FA-343	09-7-33		10-SA112
	08-8-13	08-FA-352			10-SA116
	08-8-22	08-FA-369	09-8-8		10-SA128
	08-8-23	08-FA-384	09-8-9		
	08-8-29	08-FA-387	09-8-10		
	08-8-32	08-FA-406			
	08-8-33	08-FA-476			
	08-8-45	08-FA-544			
	08-8-47	08-FA-623			
	08-8-48	08-FA-633			
	08-8-50				

소포자 유래 배 발생을 유도하기 위해 1.0 NLN 배지에 0.5배의 미량 요소를 첨가하였다(Lichter 1982). 소포자 배양 용 배지에 첨가되는 activated charcoal은 증류수 100 mL에 agarose 5.0 g과 activated charcoal 1.0 g을 첨가한 후 고압으로 멸균한 후 1개의 petri dish에 0.1 mL씩 분주하였다. 또한 소포자 배양 용 배지에 첨가되는 sucrose는 $130.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 농도로 첨가하였다.

화뢰 구조 관찰

화뢰의 구조는 개화 전 꽃봉오리를 채취하여 SteREO Discovery V12(Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada)를 이용하여 8배로 확대하여 관찰하였다.

현미경을 이용한 해부학적 관찰

꽃봉오리로부터 채취한 약은 0.05M sodium cacodylate buffer(pH 7.2)에 2%(v/v) glutaraldehyde와 2%(v/v) para-formaldehyde를 첨가한 Karnovsky's 고정액(Karnovsky 1965)을 이용하여 4°C에서 하루 동안 1차 고정시킨 후, 0.05 M sodium cacodylate buffer(pH 7.2)를 이용하여 10분씩 3회 세척하였다. 시료는 0.05M sodium cacodylate buffer에 1% (w/v) osmium tetroxide를 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 2차 고정하였다. 고정된 시료는 증류수를 이용하여 2번 정도 깨끗이 세척한 후 en bloc staining을 위해 4°C에서 하루 동안 0.5% uranyl acetate 용액으로 염색시켰다. 그 후 30, 50, 70, 80, 90, 100, 100% ethanol로 각각 10분 동안 탈수시킨 후 시료를 포매하기 위해 상온에서 100% propylene oxide에 15분씩 2회 교체하면서 침지시켰다. 시료는 100% Spurr's resin으로 포매하여 70°C의 오븐에서 하루 동안 경화시켰으며 경화된 시료는 초미세절단기(RMC-MTX, Research and Manufacturing Company, Germany)를 이용하여 100 mm의 두께로 절단하여 슬라이드 위에 치상하였다. 시료를 uranyl acetate에 7분간 처리한 후 증류수로 세척하고 lead citrate로 15분간 처리한 후 다시 증류수로 세척하는 염색 과정을 거쳐 자연 건조한 후 광학현미경(Axiophot, Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany)으로 검경하였다.

소포자 유래 배 밀도

일회용 Hemocytometer(C-Chip DHC-NO1-5, Incyto CO., Ltd., Chunan, Korea)를 이용하여 피펫으로 hemocytometer의 injection 부분인 A와 B에 각각 10 μL 의 배양액을 취하여

각각 떨어뜨려 현미경으로 관찰하여 1 mm²안에 든 세포 수를 세었다. Hemocytometer 1 mm² 한 칸의 용적은 0.0001 mL (길이 $\times$ 너비 $\times$ 높이 : $0.1 \times 0.1 \times 0.1 \text{ cm} = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ mL}$)이므로 센 세포 수의 계산은 샘플 1 mL 당 1 mm²한 칸에 든 평균 세포 수에 10^4 를 곱한 수로 환산하여 계산하였다.

공초점 현미경을 이용한 소포자의 발달 단계 관찰

시료는 공초점 현미경(Confocal Laser Scanning Microscope, LSM 510, Inc., Oberkochen, Germany)을 이용하여 소포자 내 핵의 위치 및 핵의 발달 과정을 관찰하였다. 현미경의 측정 범위는 $0.35 \times 0.35 \text{ mm}$ 이었으며 파장은 780 nm의 10.1%로 조정하였다.

DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색법은 형광 염색제인 DAPI를 이용한 DNA 염색 방법으로 푸른색의 형광을 탐지하여 염색된 부위를 알 수 있다. DAPI 염색법은 일반적으로 DNA를 염색함으로써 핵과 염색질의 형태를 확인하거나 세포 핵으로의 투과율을 형광 반응 정도로 비교하기 위하여 사용된다. DAPI는 세포막을 투과하여 DNA와 결합하게 되고, 이 때 358 nm(Max.) 정도 파장대의 빛을 흡수하여 blue~cyan 계통의 형광을 발하며 일반적으로 DAPI 염색 시간은 15분 정도가 소요된다. 그러나 본 연구에 사용한 시료는 세포벽이 두꺼워 DAPI 염색제가 조직 안으로 침투하는데 시간이 많이 소요되었으므로 형광 반응이 느리게 일어나 1시간 정도 염색시킨 후 공초점 현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

브로콜리 계통별 소포자 유래 배 발생

브로콜리 74 계통의 소포자 유래 배 발생 수를 조사하였다(Table 2). 다른 배추과 작물과는 달리 브로콜리에서는 소포자 유래 배 발생이 잘 되지 않았다. 실험에 사용한 브로콜리 총 74 계통 중 소포자 유래 배 발생이 확인된 계통은 05-8-3, 08-8-1, 08-8-5, 08-8-8, 08-8-13, 08-8-33, 08-8-48, 08-8-50, 08-FA-315, 08-FA-387, 08-FA-476, 09-6-19, 09-6-21, 09-7-25, 10-SA1, 10-SA97, 92-8-11, 92-8-13으로 총 18개 계통이었다. 이 중 08-8-8과 08-8-33 두 계통에서만 petri dish 당 평균 20개 이상의 소포자 유래 배가 발생하였고(Fig. 4), 그 외 16 계통에서는 petri dish 당 소포자 유래 배가 5개 이하로 적게 발생하였다. 따라서 소포자 유래 배 발생이 잘 되는 계통

Table 2. No. of microspore-derived embryo in broccoli lines.

Line	No. of microspore embryo	Line	No. of microspore embryo
05-8-3	1	08-FA-387	2
08-8-1	1	08-FA-476	1
08-8-5	1	09-6-19	1
08-8-8	30	09-6-21	2
08-8-13	5	09-7-25	5
08-8-33	20	10-SA1	5
08-8-48	8	10-SA97	1
08-8-50	1	92-8-11	2
08-FA-315	2	92-8-13	1

08-8-8과 소포자 유래 배 발생이 되지 않은 08-8-10계통을 대표 계통으로 선정하여 소포자 유래 배 발생 효율과 브로콜리 화퇴 크기, 약과 화판의 크기 및 비율, 소포자 발육 단계와의 상관관계를 구명하기 위한 실험을 진행하였다.

화퇴 크기에 따른 화기 구조 관찰

소포자 유래 배 발생이 잘 되는 계통 08-8-8과 소포자 유래 배 발생이 되지 않은 08-8-10 두 계통을 화퇴의 크기에 따라 S(0.1~0.2 mm), M(0.2~0.4 mm), L(0.4~0.6 mm)로 분류하고 화퇴의 크기에 따른 약과 화판의 크기 및 비율 등을 관찰하였다(Fig. 1).

소포자 유래 배 발생 효율이 높은 08-8-8 계통과 소포자 유래 배 발생 효율이 낮은 08-8-10 계통 사이의 화퇴의 구조적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 화퇴의 크기가 M 사이즈인 경우에만 주두의 길이가 화엽의 길이보다 더 길었으나, 92-8-4

계통은 M 사이즈 뿐 아니라 L 사이즈에서도 주두의 길이가 화엽의 길이보다 길었다. 기존의 소포자 배 발생을 위한 연구에서는 모식물체의 화퇴로부터 소포자를 분리하는 시기를 주두와 화엽의 길이 차이로 결정하였으며 이와 같은 기준은 배추과 작물의 모든 품종 및 계통에 적용되어 사용되어져 왔다 (Olmedilla 2010). 그러나 본 실험의 결과는 주두의 길이가 화엽의 길이보다 긴 화퇴에서 1핵성 후기 소포자의 함유율이 가장 높게 나타나 소포자 유래 배 발생 효율이 높다는 기존의 보고 및 소포자 분리 시기에 대한 기준이 모든 배추과 작물에 적용될 수 없음이 확인 되었다(Croser et al. 2011).

현미경을 이용한 품종 및 계통별 소포자 밀도

S 사이즈의 화퇴에서는 소포자가 전혀 관찰되지 않았다. 화퇴의 크기가 M과 L 사이즈의 경우 소포자 유래 배 발생 효율이 높은 08-8-8 계통이 소포자 유래 배 발생 효율이 낮은

Fig. 1. Flower structure by flower bud size (A, 0.2~0.4 mm; B, 0.4~0.6 mm) in 08-8-8 and 08-8-10 broccoli lines.

Fig. 2. Microspore density by flower bud size of 08-8-8 and 08-8-10 broccoli lines.

08-8-10 계통에 비해 소포자 함유량이 많은 것으로 확인되었다(Fig. 2). 또한 화뢰의 크기가 큰 L 사이즈가 M 사이즈보다 소포자의 함유량이 많은 것으로 확인되어 화뢰가 발달하면서 소포자의 양도 증가하는 것으로 판단되었다. 따라서 화뢰가 함유하고 있는 소포자의 양이 소포자 유래 배의 발생에 큰 영향을 미치는 것으로 생각되어지며 소포자의 함유량을 비교하여 소포자의 배양에 사용될 화뢰의 양을 결정하는 것이 좋으리라 판단되어진다.

화뢰의 크기에 따른 소포자의 발달 단계

소포자 유래 배 발생 효율이 높은 08-8-8 계통의 경우 M 사이즈의 화뢰에서 소포자 유래 배 발생 효율이 가장 높은 단계로 알려진 1핵성기의 소포자의 함유율 91.3%로 가장 높았다(Fig. 3, Table 3). 그러나 08-8-10 계통의 M 사이즈에서는 1핵성기의 소포자의 함유율이 가장 낮았으나 L 사이즈에서는 1핵성기의 소포자의 함유율이 가장 높아 단지 화뢰의 크기와 주두와 화엽의 길이만으로 화뢰로부터 소포자의 분리 시기를 결정하는 것은 적합하지 않다는 것이 확인되었다(Fig. 3, Table 3).

Fig. 3. Developmental stage of microspores of M size flower bud in 08-8-8 (A) and 08-8-10 (B) broccoli lines.

Fig. 4. Microspore-derived embryo 4 weeks after microspore isolation.

따라서 화뢰의 크기에 따른 소포자의 밀도, 소포자의 발달 단계 그리고 소포자 유래 배의 발생 효율에 관한 좀 더 깊이 있는 연구가 수행되어 이들 간의 상관관계를 밝혀야 한다고 판단된다.

Table 3. Percentages of developmental stage of microspores by flower bud size of 08-8-8 and 08-8-10 broccoli lines.

Line	Flower bud size (mm)	Developmental stage of microspores (%)		
		Non	Unicellular stage	Bicellular stage
08-8-8	0.2~0.4	8.7	91.3	0.0
	0.4~0.6	50.0	23.7	26.3
08-8-10	0.2~0.4	52.2	45.7	2.2
	0.4~0.6	37.0	33.3	29.6

적 요

브로콜리 74 계통 화기 구조를 통한 소포자 배 발생을 살펴본 결과 18개 계통에서 소포자 유래 배 발생이 확인되었다. 특히 08-8-8 계통과 08-8-33 계통에서 petri dish 당 20개 정도의 소포자 유래 배 발생이 확인되었다. 높은 소포자 유래 배 발생 계통인 08-8-8 계통과 소포자 유래 배 발생이 되지 않는 08-8-10 계통을 대상으로 화뢰의 크기에 따른 소포자 발달 단계 및 밀도를 조사하였다. 소포자 유래 배 발생 효율이 높은 08-8-8 계통과 소포자 유래 배 발생 효율이 낮은 08-8-10 계통 사이에 화뢰의 구조적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 화뢰의 크기가 M 사이즈인 경우에만 주두의 길이가 화엽의 길이보다 더 길었다. 화뢰의 크기와 소포자 수와는 정적 상관을 나타내었으나 S 사이즈의 화뢰인 경우에는 소포자를 관찰할 수 없었다. 화뢰 당 소포자 밀도는 08-8-10 계통보다 08-8-8 계통에서 높게 나타났으며, 화뢰 M 사이즈의 1헥성 후기 소포자 비율은 08-8-8 계통에서는 91.3%, 08-8-10 계통에서는 45.7%로 나타났다.

사 사

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 20110014561)에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

1. Aionesei TE, Touraev A, Heberle-Bors E. 2005. Pathways to microspore embryogenesis. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K.J. pp. 11-34. eds. Biotechnology in Agriculture and Forestry. V. 56, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.
2. Ali MM, Khaleque Mian MA, Custuers J B M, Khurram M M H. 2008. Microspore culture and the performance of microspore derived doubled haploid in *Brassica juncea* (L.). Bangladesh J. Agril. Res. 33: 571-578.
3. Barro F, Fernandez-Escobar JM, Vega De la, Martin A. 2003. Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. Euphytica 129: 1-6.
4. Chun C, Park H, Na H. 2011. Microspore-derived embryo formation in radish (*Raphanus sativus* L.) according to nutritional and environmental conditions. Hort. Environ, Biotechnol. 52: 530-535.
5. Croser JS, Lulsdorf MM, Grewal RK, Usher KM, Siddique KHM. 2011. Isolated microspore culture of chickpea (*Cicer arietinum* L.): induction of androgenesis and cytological analysis of early haploid divisions. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 47: 357-368.
6. Gu HH, Zhou WJ, Hagberg P. 2003. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. Euphytica 134: 239-245.
7. Lichter R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzen physiol. 105: 427-434.
8. Lionneton E, Beuret W, Delaitre CO, Chatt S, Rancillac M. 2001. Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). Plant Cell Rpt. 20: 126-130.
9. Na H, Hwang G, Kwak J, Chun C. 2011a. The effects of plant growth regulators, activated charcoal, and AgNO₃ on microspore derived embryo formation in Broccoli (*Brassica oleracea* L. car italica). Hort. Environ. Biotechnol. 52: 524-529.
10. Na H, Hwang G, Kwak J, Yoon M, Chun C. 2011b. Microspore derived embryo formation and doubled haploid plant production in broccoli (*Brassica oleracea* L. car italica) according to nutritional and environmental conditions. African Journal of Biotechnology 10: 12535-12541.
11. Olmedilla A. 2010. Microspore Embryogenesis. In: Pua EC, Davey MR. V. 2. pp. 27-44. eds. Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.
12. Phippen C. 1990. Genotype plant bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Theor. Appl. Genet. 79: 33-38.
13. Telmer CA, Simmonds DH, Newcomb W. 1992. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. Physiol. Plant. 84: 417-424.
14. Weber S, Unker F, Friedt W. 2005. Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment in vitro and ploidy determination by flow cytometry. Plant Breed. 124: 511-513.
15. Wong RSC, Zee SY, Swanson EB. 1996. Isolated microspore culture of Chinese flowering cabbage (*Brassica campestris* ssp. *parachinensis*). Plant Cell Rpt. 15: 396-400.

16. Zaki AM, Dickinson HG. 1990. Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *B. napus*. Protoplasma 156: 149-162.
17. Zhou WWJ, Tang GGX, Hagberg PP. 2002. Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus*. Plant Growth Regulat. 37: 185-192.