

부추의 미수분 자방배양에 의한 식물체 재분화

윤수진 · 손재근* · 권용삼
경북대학교 농과대학 농학과

Plant Regeneration from Unpollinated Ovary Culture in *Allium tuberosum* Rottl.

YOUN, Soo Jin · SOHN, Jae Keun* · KWON, Yong Sham

Department of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

ABSTRACT This study was carried out to determine the optimal conditions for the production of plants derived from the unpollinated ovary culture of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl.). The Chinese chive collected from Korea showed much higher frequency of plantlet formation than those from Japan in the culture of unpollinated ovaries. Among the collections, 'Youngiljaerae' showed the highest frequency of plantlet formation. The MS basal medium was superior to B₅ in plantlet formation. The ovaries inoculated on the 2,4-D-free medium were directly induced plantlets without callus formation. Floral parts inoculated as a unit played important roles in callus formation and plant production. The frequency of callus and plantlet formation was higher in the culture of ovary with anthers than that of ovary alone.

Key words: Ovary culture, Chinese chive

서 론

우리 나라에서 부추는 예로부터 재배되어 왔지만 최근까지 품종개량에 관한 연구가 체계적으로 수행되지 못하여 대부분의 농가에서는 그 특성이 불분명한 재래종과 일본에서 수입된 품종을 재배하고 있는 실정이다.

최근 국내에서 건강채소로서의 부추에 대한 중요도가 높아지면서 부추의 재배면적과 생산량이 매년 높아지고 있고, 이에 따른 종자의 해외의존도 또한 집단 시설재배지를 중심으로 크게 증가하고 있다. 일본에서는 이미 1950년대부터 품종개량에 관한 연구가 수행되어져 오늘날까지 다수의 신품종이 육성 보급되고 있으나, 우리 나라에서는 재래부추에 대한 세포학적 (Lee 1988), 생리생태적 특성 (Chung and Youn 1996) 및 주요 작물학적 특성 (Kim et al. 1998)에 대한 단편적인 연

구보고가 있는데 불과하다.

부추는 종자번식과 더불어 포기나누기에 의한 영양번식도 가능한 작물이고 단위생식에 의한 결실률도 매우 높은 작물로 알려져 있는데 (Kojima and Kawaguchi 1989; Kojima et al. 1991) 부추의 이러한 특성은 잡종강세를 이용하는 1대 잡종의 육성과 이의 보급전망을 매우 밝게 하는 요소가 될 것이다. 부추의 품종개량 성과를 높이기 위해서는 국내외에서 수집된 다양한 유전자원의 광범위한 특성평가, 개화생리와 종자의 결실과정, 유망한 교배친의 선정과 순계육성 등에 대한 연구가 체계적으로 이루어져야 될 것이다. 만약 수분되지 않은 부추의 자방을 기내에 배양하여 난세포 유래의 식물체를 생산하게 된다면 부추의 단위생식에 의한 종자 결실과정 구명과 순계의 조기선발을 통한 육종연한단축 등에 크게 기여하게 될 것이다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 수집된 재래부추의 미수분 자방으로부터 식물체를 재분화시키기 위하여 이에 영향을 미치는 배지와 성장조절제의 조성 등에 대한 몇 가지 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

*Corresponding author. Tel 053-950-5711
E-mail jhsohn@bh.kyungpook.ac.kr

재료 및 방법

본 실험에는 1994년과 1995년에 국내 농가포장 및 자생지에서 수집된 '대구재래', '영일재래', '영덕재래'와 일본에서 도입된 '그린벨트'와 '빅그린'을 공시품종으로 이용하였다.

1996년과 '97년 5~6월에 경북대학교 농과대학 실습포장에 재배된 공시품종들의 개화직전에 화뢰를 채취하여 현미경하에서 화분발육단계를 관찰하고 1핵성 화분소포자를 가지는 화뢰의 외관적 특성을 조사하여 화경이 10 cm 정도 부착되게 절취하였다. 각 계통의 화뢰로부터 자방을 채취하기 전에 70%에탄올로 표면을 소독하고 멸균수로 2~3회 세척한 다음, 꽃잎을 조심스럽게 제거하고 자방을 절취하여 2,4-D (1 mg/L), sucrose (30 g/L), gelrite (5 g/L)를 첨가한 MS 및 B₅ (Gamborg et al. 1968)배지가 각각 20 mL씩 분주된 샤프레 (1.5×9 cm)에 10개씩의 자방을 배양하고 25±1°C로 유지되는 항온실에서 암상태로 45일 동안 배양한 다음 캘러스와 식물체 분화율을 조사하였다. 그리고 배지내에 첨가되는 2,4-D의 농도 (0~2.0 mg/L)와 활성탄의 양 (0~5 g/L)에 따른 캘러스 형성과 식물체 분화율을 비교하였고, 자방배양에 알맞은 배양재료를 선정하기 위하여 꽃봉오리로부터 절취된 자방, 소화경과 수술이 제거되지 않은 자방, 수술만이 부착된 자방 등을 배양하여 각각의 배양 재료별로 캘러스 형성과 식물체 분화율을 비교하였다.

분화된 식물체의 염색체 검경을 위해서 뿌리의 선단을 절취하여 2 mM 8-hydroxyquinoline에 전처리한 후 acetic acid와 ethanol이 1:3으로 혼합된 용액에서 24시간 고정하였다. 고정된 시료는 1 N HCl용액 (60°C)에서 20초간 탈수시키고 45% acetic acid와 2% aceto-orcein을 각각 한방울씩 첨

Table 1. Genotypic difference of plantlet and seed formation in unpollinated ovary culture of Chinese chives.

Cultivars	No. of ovaries cultured ^a	No. of ovaries forming	
		plantlets (%)	seeds (%)
Biggreen	400	56 (14.0)	10 (2.5)
Greenbelt	200	14 (7.0)	16 (8.0)
Taegujaerae	200	56 (28.0)	62 (31.0)
Youngiljaerae	200	62 (31.0)	70 (35.0)
Youngdeogjaerae	200	50 (25.0)	54 (27.0)

^aMS + 30 g/L sucrose + 5 g/L gelrite.

Table 2. Effect of basic medium on callus and plantlet formation in unpollinated ovary culture of *Allium tuberosum* cv. Youngiljaerae.

Medium	No. of ovaries cultured ^a	No. of ovaries forming	
		calli (%)	plantlets (%)
B ₅	150	14 (9.3)	16 (10.6)
MS	150	20 (13.3)	32 (21.3)

^aMS or B₅ + 1 mg/L 2,4-D + 30 g/L sucrose + 5 g/L gelrite.

Table 3. Effect of 2,4-D concentration on callus, plantlet and seed formation in unpollinated ovary culture of *Allium tuberosum* cv. Youngiljaerae.

2,4-D (mg/L)	No. of ovaries cultured ^a	No. of ovaries forming		
		calli (%)	plantlets (%)	seeds (%)
0.0	100	0 (0.0)	28 (28.0)	26 (26.0)
0.5	300	12 (4.0)	13 (4.3)	0 (0.0)
1.0	300	18 (6.0)	12 (4.0)	0 (0.0)
2.0	200	21 (10.5)	9 (4.5)	0 (0.0)

^aMS + 0~2.0 mg/L 2,4-D + 30 g/L sucrose + 5 g/L gelrite.

Table 4. Effect of activated charcoal on callus, plantlet and seed formation in unpollinated ovary culture of *Allium tuberosum* cv. Youngiljaerae.

Activated charcoal (g/L)	No. of ovaries cultured ^a	No. of ovaries forming		
		calli (%)	plantlets (%)	seeds (%)
0.0	100	4 (4.0)	22 (22.0)	4 (4.0)
0.5	100	0 (0.0)	7 (7.0)	0 (0.0)
1.0	100	0 (0.0)	6 (6.0)	0 (0.0)
3.0	100	0 (0.0)	2 (2.0)	0 (0.0)
5.0	100	0 (0.0)	1 (1.0)	0 (0.0)

^aMS + 1 mg/L 2,4-D + 0~5 g/L AC + 30 g/L sucrose + 5 g/L gelrite.

가하여 5분간 염색하여 광학현미경으로 염색체를 검경하였다.

결과 및 고찰

부추의 미수분 자방배양에서 식물체 재분화율의 품종간 차이를 조사한 바 (Table 1), 국내 수집종인 '대구재래', '영일재래', '영덕재래'의 식물체 분화율이 25~31%로 일본 도입종인 '빅그린' (14%)과 '그린벨트' (7%)에서보다 훨씬 높게 나타났다.

그리고 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에 배양된 모든 자방에서 캘러스 형성없이 직접 식물체가 분화되는 것을 확인할 수 있었고, 특히 배양 40여일 후부터는 비대해진 자방 내에서 직접 종자가 형성되는 것도 관찰되었는데 이러한 종자 형성률도 국내 재래종들이 도입종에 비해 높게 나타났다.

국내 수집종인 '영일재래'의 미수분 자방을 2,4-D (1 mg/L)가 첨가된 MS와 B₅배지에 배양하여 캘러스 형성과 식물체 분화율을 비교한 바 (Table 2), B₅배지에 배양된 자방의 캘러스 형성과 식물체 분화율은 9.3%와 10.6%로 낮았는데 비해 MS배지에서의 캘러스 형성률은 13.3%, 식물체 분화율은 21.3%로 높게 나타났다.

배지내에 첨가되는 2,4-D의 농도가 미수분 자방배양에 미치는 영향을 조사한 바 (Table 3), 2,4-D의 양이 증가함에 따라 캘러스 형성률이 높아져 2 mg/L의 2,4-D 농도에서 캘러스 형성률이 10.5%로 가장 높게 나타났지만 식물체 분화

Table 5. Effect of explant on callus and plantlet formation in unpollinated ovary culture of *Allium tuberosum* cv. Youngiljaerae.

Explants	No. of ovaries cultured ^a	No. of ovaries forming	
		calli (%)	plantlets (%)
Ovary	100	7 (7.0)	5 (5.0)
Ovary with anther	100	10 (10.0)	20 (20.0)
Ovary with anther and pedicel	400	0 (0.0)	7 (1.8)

^aMS + 1 mg/L 2,4-D + 30 g/L sucrose + 5 g/L gelrite.

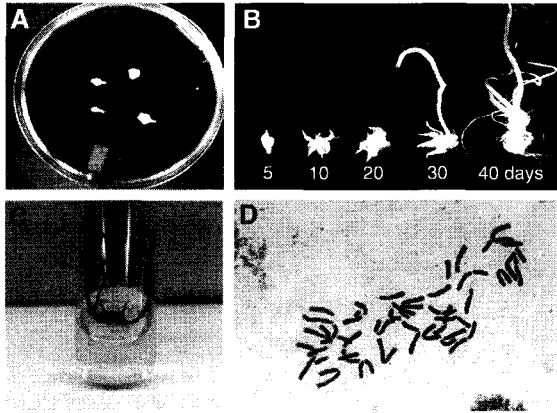


Figure 1. Plant regeneration from unpollinated ovary culture of *A. tuberosum*. A, Ovary cultured on medium; B, Plantlet development from unpollinated ovaries (5~40 days after ovary culture); C, Normal plant regenerated from ovary; D, Chromosome of ovary-derived plants ($\times 1000$).

을의 경우는 2,4-D가 첨가되지 않은 배지에서 28%로 가장 높았고, 2,4-D가 0.5 mg/L만 첨가되어도 식물체 분화율은 4.3%로 현저히 낮아졌다.

활성탄의 농도에 따른 배양효율을 조사한 바 (Table 4), 활성탄이 첨가된 배지에서는 캘러스와 종자가 전혀 형성되지 않았고 활성탄의 농도가 증가할수록 식물체 분화율이 현저히 낮아지는 경향이 있었다.

미수분 자방배양에 알맞은 배양재료를 선정하기 위하여 꽃 봉오리로부터 절취된 자방, 소화경과 수술이 제거되지 않은 자방, 수술만이 부착된 자방 등을 배양하여 각각의 배양재료 별 캘러스 형성과 식물체 분화율을 비교한 결과 (Table 5), 자방만을 배양하였을 때의 식물체 분화율은 5%로 낮은데 비해 자방과 약이 부착된 상태로 배양하였을 때의 식물체 분화율은 20%로 가장 높게 나타났다.

1 mg/L의 2,4-D가 함유된 배지에 배양된 미수분 자방은 배양 15-20일경부터 비대해짐을 관찰할 수 있었고 (Figure 1A), 배양 30여일 후부터는 자방으로부터 직접 식물체가 분화 (Figure 1B) 되거나 캘러스가 형성되는 자방도 있었는데 이들 캘러스로부터는 식물체를 얻지 못하였다. 그리고 미수분 자방으로부터 재분화된 어린 식물체를 성장조절제가 없는 MS배지로 이식하였을 때 정상 식물체 (Figure 1C)로 발육되었으며, 미수분 자방에서 재분화된 46개 식물체의 염색체수를

관찰한 바 모든 개체에서 32개로 조사되었고 반수체는 얻지 못하였다 (Figure 1D).

식물의 약 및 자방배양에서 모식물의 genotype이 배양효율에 큰 영향을 미친다는 것은 일찍부터 알려져 왔고 근년에는 이러한 genotype간 배양효율의 차이가 후대에 유전한다는 보고도 있다 (Nomura and Makara 1993). 국내외에서 수집된 부추의 미수분 자방을 배양한 본 연구에서도 이러한 genotype간 배양효율의 차이는 비교적 높게 나타나 (Table 1), 벼, 담배, 거베라 등의 자방배양에서 genotype간 차이를 종합 보고한 Yang과 Zhou (1982)의 연구결과와 같은 양상을 보였다. 부추의 미수분 자방배양에서 캘러스 형성과 식물체 분화는 B₅배지에서보다 MS배지에서 높게 나타났는데 (Table 2), 이는 *Allium*속 식물의 중간교잡된 배배양에서 MS배지가 효과적이었다고 한 Nomura 등 (1990)의 보고와 기본배지의 효과면에서 일치되는 경향이 있었다. Kojima와 Kawaguchi (1989)는 부추의 미수분 배주배양에서 배지내에 첨가되는 성장조절제는 배주의 발육을 억제하므로 성장조절제가 없는 배지에 배양하는 것이 바람직하다고 하였는데 본 연구에서도 2,4-D가 첨가되었을 때는 그 농도가 증가될 수록 캘러스 형성률은 높아졌지만 식물체는 2,4-D가 첨가되지 않은 배지에서 가장 높게 나타나 (Table 3), 부추의 자방 배양에는 hormone-free배지를 이용하는 것이 효과적인 것으로 생각된다. 그리고 성장조절제가 없는 배지에 배양된 미수분 자방에서 배양 40일 후에 종자가 형성되는 것이 관찰되었고 그 비율도 비교적 높게 나타났는데 이는 부추의 생식과정에서 난핵이 화분핵과의 접합을 하지 않고도 배를 형성하는 apomixis의 발생률이 매우 높은 식물이라고 한 Kojima와 Nagato (1992) 및 Kojima 등 (1991)의 연구보고에서와 같은 경향이라고 생각되나 이러한 종자형성과정에 대해서는 앞으로 보다 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 사료된다.

식물조직배양에서 배지내에 첨가되는 활성탄은 배지에 함유된 여러 가지 분화억제물질을 흡수하거나 성장조절제를 조절하는 기능을 갖는 것으로 보고되고 있으나 그 효과는 식물의 종류나 배양에 이용되는 조직부위에 따라 다르게 알려져 있는데, 본 연구에서 2,4-D (1 mg/L)와 0.5~5 g/L의 활성탄이 첨가된 배지에 배양된 자방은 활성탄의 농도에 관계없이 전혀 캘러스가 형성되지 않았고 식물체 분화율도 활성탄이 첨가되지 않은 배지에 비해 현저히 낮아지는 것 (Table 4)으로 보아 부추의 미수분 자방배양에서는 활성탄의 첨가효과가 없는 것으로 사료된다. Kojima와 Kawaguchi (1989)는 부추의 미수분 배주배양에서 소화경과 심피가 제거되지 않은 상태의 배주보다는 이들이 제거된 배주를 배양하였을 때 배형성률이 높았다고 하였으나 미수분 자방을 배양한 본 연구에서는 자방만을 배양한 것보다 수술이 부착된 자방배양에서 캘러스 형성률과 식물체 분화율이 높게 나타나 (Table 5) 서로 상이한 결과를 보였는데 이는 배양에 이용된 모품종의 genotype과 배양재료 및 배양방법이 다른 데서 비롯된 결과

라고 생각되어진다. 미수분 자방배양에서 분화된 식물체를 대상으로 염색체를 관찰한 바 모든 개체에서 염색체수가 32개로 조사되어 반수체를 얻지 못하였는데 (Figure 1D) 이는 부추의 미수분 배주배양에서 재분화된 134개체 중에서 반수체는 단 2개체뿐이었고 그 외 모든 개체의 염색체수는 $2n=32$ 로 조사되었으며 그 원인은 apomixis의 발생률이 매우 높았기 때문이라고 한 연구결과 (Nomura and Makara 1993)와 같은 것으로 추정되지만 앞으로 이에 대한 좀더 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 사료된다.

적 요

부추의 미수분 자방배양에서 식물체 분화에 영향을 미치는 요인을 밝히고자 국내에서 수집된 재래종 3종과 일본에서 도입된 2품종을 이용하여 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

부추의 미수분 자방배양에서 일본 도입종인 그린벨트의 식물체 분화율은 7%로 낮는데 비해 국내 수집종 3종의 식물체 분화율은 25~31%로 매우 높게 나타났고 기내에서의 종자형성률도 일본 도입종 보다는 국내 재래종에서 높게 나타났다. B₅배지에 배양된 자방의 식물체 분화율은 10.6%인데 비해 MS배지에서의 식물체 분화율은 21.3%로 높게 나타났다. 2,4-D가 첨가되지 않은 배지에 배양된 자방은 캘러스 형성과정을 거치지 않고 직접 식물체로 발달하였고 그 효율도 28.0%로 높게 나타났다. 그리고 배지내에서 2,4-D의 농도가 높아질 수록 캘러스 형성률은 증가되었으나 식물체 분화율은 현저히 줄어들었고 종자는 전혀 형성되지 않았으며 배지내에 활성탄의 첨가효과는 인정되지 않았다. 부추의 미수분 자방배양에서 자방만을 절취하여 배양하였을 때 식물체 분화율이 5%로 낮는데 비해 수술이 부착된 자방에서는 20%의 높은 분화율을 나타내었다.

인용문헌

- Chung HD, Youn SJ (1996) Comparison of chemical composition and taste of the Korean native chinese chive leaves. J Kor Soc Hort Sci 37:611-616
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50:151-158
- Kim CK, Choi JG, Yoon JT, Choi BS, Sohn JK, Kim KK, Kwon YS (1998) Growth characteristics of chinese chives (*Allium tuberosum* Rottle.) collected from Kyungbuk province. RDA J Horti Sci 40:50-55
- Kojima A, Kawaguchi T (1989) Apomictic nature of chinese chive (*Allium tuberosum*) detected in unpollinated ovule culture. Jap J Breed 39:449-450
- Kojima A, Nagato Y (1992) Diplosporous embryo-sac formation and the degree of diplospory in *Allium tuberosum*. Sex Plant Rep 5:72-78
- Kojima A, Nagato Y, Hinata K (1991) Degree of apomixis in chinese chive (*Allium tuberosum*) estimated by estrase isozyme analysis. Jap J Breed 41:73-83
- Lee MS (1988) Cytological study on wild and cultivated species of chinese chives in Korea. III. Karyotype analysis of wild and cultivated *Allium* species. Kor J Breed 20:160-164
- Nomura Y, Maeda M, Tsuchiya T, Makara K (1990) Efficient production of interspecific hybrids between *Allium chinensis* and edible *Allium* spp. through ovary culture and pollen storage. Breed Sci 44:151-155
- Nomura Y, Makara K (1993) Production of interspecific hybrids rakkyo (*Allium chinensis*) and some other *Allium* species by embryo rescue. Jap J Breed 43:13-21
- Yang HY, Zhou C (1982) *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. Theor Appl Genet 63:97-104

(접수일자 1998년 11월 9일)