

## 기내배양에 의한 쪽파의 체세포 염색체 배가

임순희 · 안장순<sup>1</sup> · 정창남<sup>\*</sup> · 한태호<sup>2</sup>

<sup>1</sup>국립 식물검역소, 전남대학교 원예학과, <sup>2</sup>농촌진흥청 농업생명공학연구원

### Chromosome Doubling of *Allium wakegi* Araki by *In Vitro* Cultures

YIM, Sun Hee · AHN, Chang Soon<sup>1</sup> · JEONG, Chang Nam<sup>\*</sup> · HAN, Tae Ho<sup>2</sup>

National Plant Quarantine Service, Anyang 430-016, Korea

<sup>1</sup>Department of Horticulure, Chonnam National University, Kwangju, Korea

<sup>2</sup>National Institute of Agricultural Biotechnology Rural Development Administration, Suwon, Korea

**ABSTRACT** Induction of embryogenic callus from *Allium wakegi* Araki explants was promoted on medium containing 2,4-D, and production of abnormal embryos from the embryogenic callus increased as 2,4-D concentration was raised. Shoot tip was found to be the best explant source for embryogenic callus formation followed in the order by bulb scale and leaf section. Medium containing 0.09 M sucrose was effective for embryogenic callus production. The regenerants from embryogenic callus on medium containing 2,4-D and BA at different concentrations consisted of diploids, tetraploids and a few mixaploids of  $2n + 4n$ , and their chromosomal aberration rate ranged from 8.0 to 33.3%. Frequency of chromosomal aberrants was the highest (18.7%) in the regenerants obtained from bulb scale-derived embryogenic callus among others. Plant regeneration rate was high (33.5%) from the shoot tip-derived embryogenic callus and the frequency of chromosomal aberrants was very low (7.0%). The plantlets regenerated on medium containing 0.26 M sucrose resulted in high chromosomal aberrants. The regenerants on medium containing sucrose at 0.09~0.20 M produced chromosomal aberrants at around 15.2~16.6%.

**Key words :** *Allium wakegi* Araki, *in vitro* chromosome doubling

### 서 론

쪽파의 기원은 Kurita (1952)가 잡종성이라고 발표한 이래 친식물이 근연 관계에 있는 대파 (*A. fistulosum* L.)와 샬롯트 (*A. ascalonicum* L.)라고 보고되고 있다. 샬롯트는 양파보다 구가 작고 분얼이 왕성한 식물이며, 구의 색에 따라 백색과 자색의 2군으로 분류되어 있어 쪽파의 백색과 자색 계통의 성립에 기여한 것으로 추정되고 있다 (Iwasa et al. 1979; Tashiro 1980, 1984). 또한 쪽파는 형태가 샬롯트 및 대파와 유사하고 많은 형질이 이 2종의 중간이어서 대파 또는 샬롯트와 혼동되는 경우가 많아 학명도 *A. fistulosum* L. var

*caespitosum*, *A. ascalonicum* 및 *A. wakegi* Araki 등 3가지로 혼동되고 있다 (McCollum 1974; Fujieda et al. 1980). 이처럼 쪽파는 이질2배체 식물로 샬롯트 및 대파가 양친종일 가능성이 큰 것으로 추정되었다. 일반적으로 계놈의 상동성의 실증 방법으로 가장 유효한 것은 잡종 식물의 감수분열 관찰에 의한 계놈 분석이지만, 쪽파는 완전 불임이므로 샬롯트 및 대파와의 교잡을 행할 수가 없다. 그러나 쪽파가 이질2배체일 경우 염색체를 배가하여 복 2배체를 만든다면 샬롯트 또는 대파와의 교잡이 가능할 것으로 판단하여 쪽파의 염색체 배가를 시도하였다. Colchicine 처리가 일반적으로 사용되고 있지만 (Ishizaka and Uematsu 1994), 쪽파는 불임 식물로 종자 처리를 할 수 없고 구조상 경정 처리도 곤란하여 기내 배양과정에서 자연적으로 발생하는 염색체 배가 개체의 선발을 시도하였다.

\*Corresponding author Tel 062-282-8812 Fax 061-242-4215  
E-mail hihaha@yahoo.co.kr

**재료 및 방법**

무안에서 수집한 쪽파의 외피를 2~3겹 벗겨 70% ethanol로 1분 동안 소독한 후 멸균수로 3번 세척하고 또 1.0% sodium hypochloride 용액에서 15분간 소독하여 멸균수로 3회 세척하였다. 식물호르몬은 2,4-D 0.45  $\mu\text{M}$ ~36.19  $\mu\text{M}$ 를 단독 첨가하거나 2.26  $\mu\text{M}$  또는 4.52  $\mu\text{M}$ 의 2,4-D와 0.44  $\mu\text{M}$  또는 4.43  $\mu\text{M}$  BA를 혼합 첨가하고 sucrose 농도는 0.03 M~0.26 M범위로 한 다양한 조합의 배지에서 배발생 캘러스를 유도하였다. 외식편으로는 0.15 cm~0.2 cm로 자른 경정과 경정 바로 바깥쪽의 인편 및 기내 배양에서 얻어진 최초의 잎조직 등 3종류로 구분하여 치상하였다. 캘러스의 상태는 배양 2개월 후에 조사했고, 이들 중 friable한 배발생능 캘러스를 선별하여 호르몬이 첨가되지 않은 MS기본배지에 이식한 뒤 형성된 embryo의 수를 해부현미경하에서 조사하였다. 위에서 얻어진 embryo를 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에서 식물체로 재분화시켰다.

재분화 식물체의 염색체수는 생장이 왕성한 근단을 0.5~1.0 cm 정도 절취하여 0.05%의 colchicine용액에 2시간 전처리하고 Carnoy's fixative에 16시간 고정한 후 1.0 N HCl에 30초간 해리하고 1.0% Feulgen으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

**2,4-D와 BA의 효과**

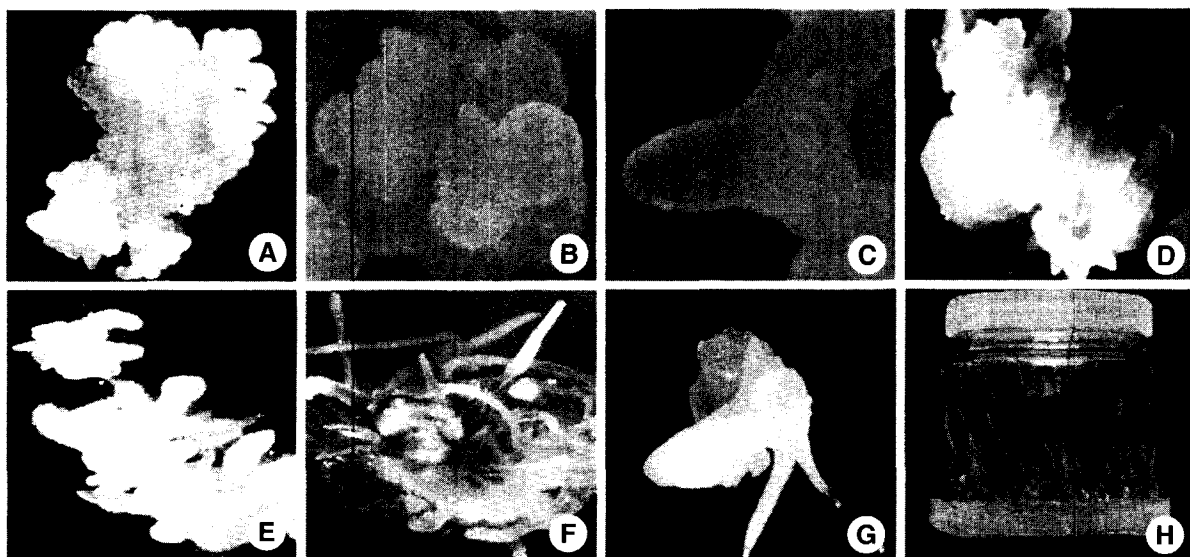
쪽파의 경정은 배양 2개월 경과 후 모든 배지에서 담황색

의 friable한 캘러스가 형성되었다. 캘러스는 경정기부 주변에서 다수의 독립된 소립괴로 형성되었다. 2,4-D단독 첨가 배지에서는 담황색의 friable 캘러스가 형성되었다 (Figure 1A).

캘러스의 증식은 2,4-D 2.26  $\mu\text{M}$ ~4.52  $\mu\text{M}$ 이 첨가된 배지에서 양호하였고, 2,4-D 18.09  $\mu\text{M}$ 이상이 첨가된 배지에서는 증식이 좋지 않았으며, 2,4-D 36.19  $\mu\text{M}$ 이 첨가된 배지에서는 치상한 경정이 거의 고사하였다. 2,4-D에 BA를 혼합 첨가한 배지에서는 2,4-D를 단독 첨가한 배지에서와 거의 비슷한 경향이었으나 캘러스의 색이 점차 옅어졌으며, BA의 농도가 높아질수록 compact한 캘러스가 형성되었다 (Table 1).

여러 배지에서 형성된 캘러스를 호르몬이 첨가되지 않은 MS기본배지에 계대배양한 결과 약 1주일 후 입상 조직을 형성하였고, 동시에 체세포배를 형성하였다 (Figures 1B, C). 4주 후 캘러스는 녹색의 기형 비대엽, 담황색의 소립 구상배조직, shoot나 root만이 발달되는 단극성 또는 shoot와 root 모두가 발달되는 양극성을 가진 embryo 등이 형성되었다.

기형비대엽은 뿌리를 형성하지 않았고 (Figure 1D), 구상배는 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서 대부분 뿌리만을 형성하였으며 (Figure 1E), 극히 일부가 shoot를 형성하였다(Figure 1F). 정상적인 embryo는 shoot가 가늘게 신장하고 뿌리도 발생하였다 (Figure 1G). 자엽이 짧고 비대하거나 캘러스화된 기형의 embryo도 상당히 많이 관찰되었다. Embryo는 캘러스당 많으면 10개 정도였고, 동일한 배지의 캘러스에도 embryo를 전혀 형성하지 않는 것도 있었다. 양파 (Nakashima et al. 1990) 및 대파와 양파의 잠종 (Shahin and Kaneko 1986) 그리고 대파 (Kim and chang 1996)의 배양에서 2,4-D 0.45  $\mu\text{M}$ 과 kinetin 0.46  $\mu\text{M}$  또는 4.6  $\mu\text{M}$  첨가배지에서 유기된 캘러스로부터 다수의 embryo가 유기되었다고 한다. 본 실험에서는



**Figure 1.** Plant regeneration through somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of *A. wakegi* Araki shoot tips. A, compact callus from shoot tips cultured on medium containing 2,4-D and BA; B-C, normal (B) and abnormal (C) embryos formed from 2 month-old callus cultured on hormone-free media; D, abnormal embryos having malformed leaves only; E, abnormal embryos having roots only; F, plantlets with slender roots and leaves; G, a normal embryo with shoot and root; H, regenerated plantlets.

**Table 1.** Effects of 2,4-D and BA on somatic embryogenesis from the callus induced from *A. wakegi* Araki shoot tips. The pre-induced embryogenic callus was subcultured on hormone-free MS medium to induce somatic embryos.

Growth regulator ( $\mu\text{M}$ )		No. of shoot tips cultured	Morphology of callus induced			No. of embryos developed	
2,4-D	BA		Diameter (mm) <sup>a</sup>	Colour <sup>x</sup>	Friability <sup>y</sup>	Normal	Abnormal
0.45	0.00	10	7.32±0.21	LY	F	5	2
2.26	0.00	10	11.77±0.36	Y	F	13	7
4.52	0.00	10	12.49±0.33	Y	F	16	19
9.04	0.00	10	8.97±0.12	Y	F	14	5
18.09	0.00	10	6.51±0.23	LY~Y	F	4	7
36.19	0.00	10	2.18±0.16	LY	F	2	7
2.26	0.44	10	10.01±0.38	Y	F	0	7
2.26	4.43	10	9.52±0.21	LY	F	0	5
4.52	0.44	10	8.62±0.14	LY	F, C	1	8
4.52	4.43	10	9.74±0.05	WY	C	0	1

<sup>a</sup> Data shown with mean±SE

<sup>x</sup> LY: light yellow, WY: whitish yellow and Y: yellow

<sup>y</sup> F: friable, C: compact

2,4-D만을 0.45  $\mu\text{M}$  ~36.19  $\mu\text{M}$  첨가한 모든 배지에서 embryogenic 캘러스를 얻을 수 있었지만, 2,4-D 농도가 높은 배지에서는 캘러스의 생장이 좋지 않았다.

Shahin과 Kaneko (1986)는 대파와 양파의 잡종 캘러스를 kinetin이나 benzyl adenin이 함유된 배지에 계대배양하여 많은 식물체를 얻었고, Phillips와 Luteyn (1983)는 pichloram이 양파의 배 형성에 효과적 이었다고 하였으며, Shilito et al. (1989)는 pichloram을 첨가한 배지에서 옥수수의 protoplast로부터 직접 구상배를 형성시키는 데 성공하였다고 보고한 바 있다. 따라서 캘러스 유기단계에서 2,4-D 이외의 auxin류의 효과를 검토해 볼 필요가 있다고 생각되어 배발생 캘러스의 형성을 촉진하기 위하여 배지에 BA를 첨가하였으나 그 효과는 좋지 않았다.

외식편에서 캘러스를 유기시키고 캘러스나 세포 상태로 배양하다 식물체를 재분화시키면 각종 염색체 이상개체가 높은 빈도로 발생하는 수가 있다. 그 원인 중 하나로, 배지에는

auxin이나 cytokinin류 및 각종 유기물이 복잡하게 배합되어 있어 이들이 세포분열 이상을 일으킬 수도 있으며, yeast extract나 2,4-D를 첨가하면 4배성 세포가 분열하며 특히 2,4-D는 염색체배가를 촉진시키는 원인이 되므로 배수체는 hormone의 농도에 따라 출현빈도가 증가한다고 하였다 (Bennici 1979).

본 실험에서 2,4-D와 BA의 농도가 다른 배지에서 유기된 배로부터 재분화한 식물체의 염색체를 관찰한 결과 일부가 배수성이었다. 배수체에는 4배성인 것과 2배성조직과 4배성조직의 키메라 개체가 있었다. 2,4-D 36.19  $\mu\text{M}$ 가 함유된 배지에서는 배발생 캘러스 유기율은 매우 낮았지만 배수체 출현율은 높았다. 2,4-D와 BA를 첨가한 배지에서 재분화된 식물체 중 염색체 이상 개체의 비율은 8.0%~33.3%였으며, 4배체와 2배체+4배체 키메라 개체가 비슷한 빈도로 나타났다 (Table 2). 기내배양에서 재분화된 많은 식물들이 유전자 돌연변이 (Karp 1991), 염색체 변이 (Fish and Karp 1986), 배수화

**Table 2.** Ploidy levels of regenerants through somatic embryogenesis from *A. wakegi* Araki shoot tip-derived callus induced on 2,4-D and BA containing MS mediaum. The pre-induced embryogenic callus was subcultured on hormone-free MS medium to induce somatic embryos and plant conversion.

Growth regulator ( $\mu\text{M}$ )		% regeneration (regenerants/embryos)	No. of plantlets by ploidy level				% chromosomal aberrants
2,4-D	BA		2X	4X	4X <	2X + 4X	
0.45	0.00	22.0 (13/59)	12	0	0	1	7.6
2.26	0.00	21.9 (25/114)	23	1	0	2	12.0
4.52	0.00	33.5 (57/170)	55	1	0	2	5.2
9.04	0.00	45.2 (94/208)	92	2	0	0	2.1
18.09	0.00	1.1 (1/90)	1	0	0	0	0.0
36.19	0.00	3.9 (4/102)	2	1	1	0	60.7
2.26	0.44	20.8 (15/72)	14	0	0	1	9.1
2.26	4.43	13.0 (22/169)	20	1	0	1	20.0
4.52	0.44	21.2 (10/47)	8	1	0	1	33.3
4.52	4.43	20.5 (8/39)	6	2	0	1	8.0

(Novak et al. 1982) 등을 보인다고 하였다. 그리고 배양중인 세포뿐만 아니라 재분화된 식물체내에서도 염색체수가 다양하게 나타나며 호밀에서는 이수체 (Bennici and D'Amato 1978), 담배에서는 삼배체 (Novak 1975), 백합에서는 이형염색체를 가진 이배체 (Bennici 1979)가 재분화되었으며, 여러 종의 식물에서 키메라 식물체가 재분화되었다고 보고되고 있다 (Orton and Steidl 1980).

외식편의 영향

외식편의 종류에 관계없이 배양 2개월 후에 모두 캘러스가 형성되었으며, 생육도 양호하였다 (Table 3). 엽절편에서는 캘러스의 생육이 비교적 저조하였고 인편기부에서는 노란색의 점성물질을 가진 friable 캘러스가 형성되었다.

모든 외식편 유래 캘러스에서 embryo가 형성되었으나 경정유래 캘러스에서 가장 많이 형성되었으며 그 중 50%정도가 정상적인 embryo였으나 엽절편 배양에서는 비정상적인 배만이 나타났다. 인편 기부에서 왕성한 증식을 보였으며, 경정 근처 유래의 embryogenic 캘러스에서 배가 다수 형성되었다. 쪽파의 외식편에서의 증식은 경정 부위가 가장 높았다.

Lu 등 (1989)은 과와 양과간의 잡종 식물체의 배양에서 얻은 캘러스를 호르몬이 없는 배지에 옮긴 후에 embryo 형성이 이루어졌고, 양과의 배양에서는 캘러스 유기 단계에서 배가 형성되었다고 보고하였다. 본 실험의 쪽파에서는 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에 이식한 후에 embryo가 형성되었다.

식물의 조직이나 기관을 배양했을 때 나타나는 염색체 이상은 일부는 배양전 조직편에서 유래하고 일부는 캘러스의 형성기나 그 후의 세포 분열과정에서 발생하는 것으로 알려져 있다.

경정과 인편조직 유래 식물체에서 염색체 변이가 보였다. 염색체 이상은 인편 유래 식물체에서 18.7%로 가장 높았으며,

경정 부위에서 유기된 체세포배에서는 재분화율은 높았지만 (33.5%), 염색체 이상은 7.0% 정도로 인편유래 식물체에서 보다 훨씬 낮았다. 엽조직에서는 캘러스가 거의 유기되지 않았으며, 재분화율도 4.8%로 매우 낮았고 염색체 배가 식물체도 관찰되지 않았다 (Table 4).

Sucrose 농도의 영향

삼투압 스트레스가 배발생 캘러스의 형성을 촉진한다는 사실 (Novak et al. 1982)이 인정되었고, 펠론에서는 sucrose 농도를 0.2 M로 높인 2,4-D 첨가배지에서 배 형성률이 높았다는 보고가 있어, sucrose 농도가 다른 배지에서 캘러스 형성을 유기한 결과 배발생 캘러스 형성률은 거의 비슷하였지만, sucrose 농도가 0.09 M인 배지에서 정상적인 embryo가 가장 많이 형성되었고, sucrose 농도가 높아질수록 떨어졌다 (Table 5). 이와같이 쪽파에서는 고농도의 sucrose에서 배의 형성이 오히려 저하되어 체세포배 형성에 관한 sucrose의 영향은 식물의 종류에 따라 다를 수 있었다.

초기 캘러스 유기 배지의 sucrose 농도가 재분화 식물체의 염색체 변이에 미치는 영향을 조사한 결과 고농도인 0.26 M sucrose배지에서 유기된 캘러스로부터 재분화된 식물체는 염색체변이율이 높았고, 0.09 M~0.20 M에서 유기된 캘러스로부터 재분화된 식물체는 15.2%~16.6%로 비슷하였다 (Table 6).

재분화 식물체의 염색체변이는 캘러스 세포에서보다 다양성이 낮다고 하므로 (Orton 1980) 캘러스의 재분화 과정에서 특정 염색체 구성 세포계만을 선발할 수도 있을 것이다.

외관적으로 정상적인 embryo의 약 20%는 식물체로 발육하였고, 캘러스화된 기형 embryo는 모두 식물체로 발육되지 못했다. 식물체로 분화된 배에서는 뿌리가 신장된 후, 자엽기부에서 제 1본엽이 전개하였고, 정상적으로 성장하였다. 식물

**Table 3.** Effect of explant source on callus morphology of *A. wakegi* Araki and embryo development from the embryogenic callus subcultured on phytohormone-free MS medium.

Explant source	No. of explants cultured	Callus morphology		No. of embryos developed	
		Diameter (mm) <sup>a</sup>	Colour <sup>x</sup>	Normal	Abnormal
Shoot tip	10	12.49 ± 0.58	Y	16	19
Bulb scale	10	0.64 ± 0.23	Y	2	5
Leaf section	10	0.21 ± 0.82	G	0	7

<sup>x</sup> Y: yellow, G: green

Preculture medium: MS + 2,4-D 1.0 mg/L

**Table 4.** Ploidy level of regenerants through somatic embryogenesis in *A. wakegi* Araki by explant sources.

Explant source	% regenerantion (regenrants/embryos)	No. of plantlets by ploidy level				% chromosomal aberrants
		2X	4X	4X <	2X + 4X	
Shoot tip	33.5 (57/170)	53	2	1	1	7.0
Bulb scale	32.8 (19/58)	16	1	1	1	18.7
Leaf section	4.8 (1/21)	1	0	0	0	0.0

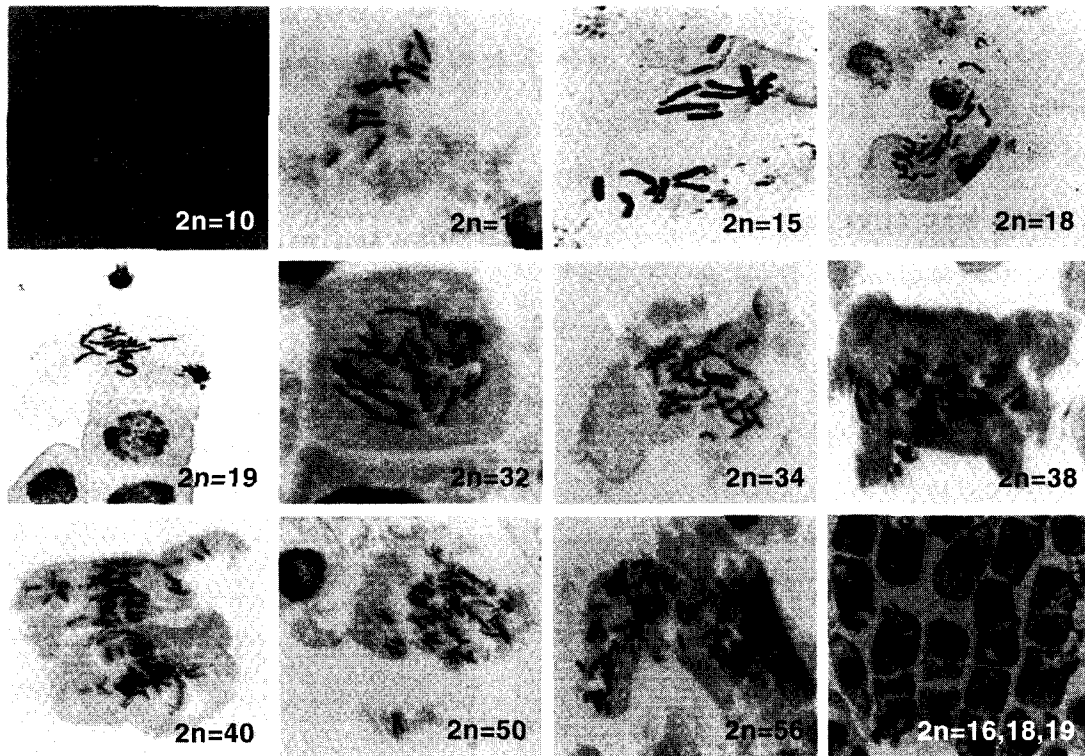
**Table 5.** Effect of sucrose concentration in preculture medium on callus morphology of *A. wakegi* Araki and embryo development from the shoot tip-derived embryogenic callus subcultured on hormone-free MS medium.

Sucrose concentration (M)	No. of shoot tips cultured	Callus morphology		No. of embryos developed	
		Diameter	Colour <sup>^</sup>	Normal	Abnormal
0.03	10	6.87 ± 0.72	LY	13	11
0.09	10	7.57 ± 0.05	Y	21	15
0.15	10	7.32 ± 0.09	LY	8	12
0.20	10	10.65 ± 0.28	LY	4	9
0.26	10	9.83 ± 0.34	LY	5	7

<sup>^</sup>LY: light yellow, Y: yellow

**Table 6.** Ploidy level of regenerants through somatic embryogenesis in *Allium wakegi* Araki (W1) on medium with different sucrose concentrations.

Sucrose concentration (M)	% regeneration (regenerants/ embryos)	No. of plantlets by ploidy level				% chromosomal aberrants
		2X	4X	4X <	2X + 4X	
0.03	17.0 (7/41)	7	0	0	0	0.0
0.09	20.6 (13/63)	11	1	0	1	15.2
0.15	19.3 (18/93)	17	1	0	0	16.5
0.20	10.0 (6/60)	4	0	0	0	16.6
0.26	19.0 (8/42)	6	2	0	1	37.5



**Figure 2.** Various type of chromosomal aberrants, hypoploids (< 2n) and hyperploids (> 2n) observed from *A. wakegi* regenerated plants.

체로 재생되지 못한 배는 자엽이 약간 신장 비대하다 생장이 정지하고 고사하였다. 재분화된 식물체는 순화를 거쳐 순조롭게 활착하였고, 정상적으로 생육하였다. 외관상 정상적인 embryo 중 shoot와 root의 양극을 가진 것으로 보였으나, 이들을 새로운 배지에 이식후 본엽을 전개하지 못한 것이 많았고

식물체로의 재생률이 현저히 떨어졌다. 이는 embryo의 유아분열 조직이 어떤 원인으로 고사하여 생장을 정지한 것으로 추측된다. 그 원인을 해명하여 배로부터 효율적인 재생조건을 규명하는 것이 필요할 것이다.

## 적 요

쪽파의 배발생 캘러스 유도에는 2,4-D의 단독첨가가 보다 효과적이었으나, 2,4-D의 농도가 높을수록 기형배의 배발생율이 높았다. BA를 혼합첨가하였을 때는 기형배가 보다 많이 발생하였다. 배형성을 위한 외식편으로는 경정이 가장 좋았으며 그 다음 인편, 엽조직 순이었다. 또한 0.09 M의 sucrose를 첨가한 배지에서 배발생 callus 유기가 가장 좋았다. 2,4-D와 BA의 농도가 상이한 배지에서 유기된 배발생 callus로부터 재분화된 식물체의 염색체 변이율은 8~33.3%였으며, 4배체와 2배체 + 4배체의 혼수체가 나타났다. 염색체 변이율은 인편 유래의 식물체에서 18.7%로 가장 높았다. 경정 부위에서 유기된 배발생 callus는 33.5%로 식물체 재분화율이 높았지만, 염색체 변이율은 7.0% 정도로 낮았다. 또한 0.26 M sucrose배지에서 배양한 식물체에서 염색체 변이율이 높았으며, 0.09~0.20 M sucrose배지에서 분화된 식물체에서 염색체 변이율은 15.2~16.6%로 거의 안정적이었다.

사사 - 본 논문은 2000년도 전남대학교 연구년교수연구비에 의하여 연구되었음.

## 인용문헌

- Bennici A** (1979) A cytological chimeras in plants regenerated from *Lilium longiflorum* tissues grown *in vitro*. *Plant Syst Evol* **82**:349-353
- Bennici A, D'Amato F** (1978) *In vitro* regeneration of durum wheat plants. 1. Chromosome numbers of regenerated plants. *Plant Syst Evol* **81**:305-311
- Fish N, Karp A** (1986) Improvements in regeneration from protoplasts of potato and studies on chromosome stability. 1. The effect of initial culture media. *Theor Appl Genet* **72**:405-412
- Fujieda K, Adaniya S, Okubo H, Takahashi K., Matsuo E** (1980) studies on the intraspecific differentiation of *Allium wakegi* Araki. *J Jap Soc Hort Sci* **49**:180-188
- Ishizaka H, Uematsu J** (1994) Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill and *C. hederifolium* Aiton induced through colchicine treatment of ovules and *in vitro* plants. *Breed Sci* **44**: 161-166
- Iwasa S, Imada I, Suzuki Y** (1979) Karyotype analysis of *Allium fistulosum*, *A. cepa*, *A. proliferum*, and *A. wakegi* by Giemsa banding technique. *Abstr Jap Soc Hort Sci Autumn Meet* pp194-195
- Karp A** (1991) On the current understanding of somaclonal variation. *Plant Mol Cell Bio* **2**:1-58
- Kim CH, Chang KY** (1996) Variation of cross affinity and reciprocal effect in interspecific hybridization between *Glycine max* and *G. tomentella*. *Kor J Crop Sci* **41**:608-618
- Kurita M** (1952) Further note on the karyotypes of *Allium*. *Mem Ehine Univ Sect II*. **1**:369-378
- Lu CC, Currah L, Peffly EB** (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid *Allium fistulosum* × *A. cepa* F<sub>1</sub> hybrid onions. *Plant Cell Rep* **7**:696-700
- McCollum GD** (1974) Chromosome behavior and sterility of hybrids between the common onion, *Allium cepa* and related wild *A. oschanini*. *Euphytica* **23**:699-712
- Nakashima T, Kuwahara K, Tanaka M** (1990) The development of utilization methods of embryoid and shoot primodium in *Cucubitaceae* and *Liliaceae* plants (Ⅲ) *In vitro* mass-propagation of onion (*Allium cepa* L.). *Bull Saga Pref Agr Exp Stn* **26**:119-132
- Novak F, Vyskot B** (1975) Karyotype of callus culture derived from *Nicotina tabacum* L. *Plant Syst Evol* **75**:62-70
- Novak FJ, Havel L, Dolezel J** (1982) *In vitro* breeding system of *Allium*. *Proc 5th Intl Cong Plant Tiss Cell Cult* pp767-768
- Orton TJ, Steidl RP** (1980) Cytogenetic analysis of plants regenerated from colchicine-treated callus cultures of an interspecific *Hordeum* hybrid. *Theor Appl Genet* **57**:89-95
- Phillips GC, Luteyn KJ** (1983) Effects of pichloram and other auxins on onion tissue cultures. *J Am Soc Hort Sci* **108**:948-953
- Shahin HA, Kaneko K** (1986) Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of nonbulbing onions. *HortSci* **21**:294-295
- Shillito RD, Carswell GK, Jhonson CM, DiMio J, Harms CT** (1989) Regeneration of fertile plant from protoplast of elite imbred maize. *Biotech* **7**:581-587
- Tashiro Y** (1980) Cytogenic studies on the origin of *A. wakegi*. I. Meiosis in *A. wakegi*. and the interspecific hybrid between *A. fistulosum* L. and *A. ascalonicum* L. *Agr Bull Saga Univ* **49**:47-57
- Tashiro Y** (1984) Karyotype, meiotic behavior and fertility of the hybrid between the tetraploid *Allium wakegi* Araki and amphidiploid (*A. ascalonicum* L. × *A. fistulosum*) *J Jap Soc Hort Sci* **52**:408-413