

# 양파의 성숙배 배양을 통한 체세포배발생 캘러스 유기 및 식물체 재분화

조광수<sup>1\*</sup>, 허은주<sup>2</sup>, 홍수영<sup>1</sup>, 문지영<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 고령지농업연구소 원예과, <sup>2</sup>농촌진흥청 원예연구소 화훼과

## Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration by Mature Embryo Culture of Onion (*Allium cepa* L.)

Kwang-Soo Cho<sup>1\*</sup>, Eun-Joo Hur<sup>2</sup>, Su-Young Hong<sup>2</sup>, Ji-Young Moon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Horticulture Research Division, National Institute of Highland Agriculture, Pyeongchang, 232-955, RDA, Korea

<sup>2</sup>Floriculture Research Division, National Horticulture Research Institute, Suwon, 441-100, RDA, Korea

**ABSTRACT** To obtain regeneration system of onion, we analyzed the effects of 2,4-D and BA concentration on the embryogenic callus induction from mature embryos. The highest embryogenic callus induction ratio was shown on MS medium (Murashie and Skoog 1962) containing 2.5 mg/L or 5 mg/L picloram after mature embryos were placed on medium. When induced callus were cultured on half strength of MS medium containing 1 mg/L Kinetin, the highest shoot formation ratio was observed on MS medium containing 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BA. Embryogenic callus were cultured in MS liquid medium containing 1 mg/L of 2,4-D and 1 mg/L BA. The suspension cultured cell clumps could be mass propagated. Embryogenic callus were friable, but non-embryogenic callus included a lot of moisture, hence the identification between embryogenic and non-embryogenic callus as easily achieved. When embryogenic callus as cultured on half strength of MS medium containing 1 mg/L Kinetin, shoots were induced. The whole plantlet was obtained on rooting medium containing 0.5 mg/ of NAA.

**Key words:** Acclimatization, suspension culture

### 서 론

양파 (*Allium cepa* L.), 파 (*A. fistulosum*), 마늘 (*A. sativum*) 등이 속하는 인경채류 (Liliceae)는 국내 조미채소의 중요한 부분을 차지하고 있으며 이중 양파의 재배면적과 총생산량은 각각 12,352 ha, 735 백만톤으로 농업적으로도 매우 중요한 작물이다 (Ministry of Agri. and Forestry, 2003). 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 형질전환을 이용한 품종개량 및 유용형질의 도입에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 이러한 원인은 양파가 단자엽 식물로 쌍자엽 식물보다 형질전환의 효율이 낮고 파종 후 2년이 경과

한 후 꽃이 피는 2년생 작물로서 형질전환체의 특성검정에 많은 기간이 필요하기 때문에 판단된다. 양파의 조직배양은 주로 원형질체 배양 (Hansen et al. 1995) 및 순원기배양 (Primodium culture)을 통한 대량증식 (Jeong and Park 1997)과 지방배양을 통한 반수체 유기에 대한 연구결과 (Keller 1990) 등이 있으며 형질전환에 대한 연구는 Dommissse 등 (1990)이 최초로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 가능하다고 보고 한 후 양파의 미성숙배에 유전자총을 이용하여 GUS 유전자의 transient assay를 확인한 보고 (Eady et al. 1996) 등이 있다. 또한 양파의 현탁배양 (suspension culture)은 고체배지에서의 배양보다 호르몬과 양분의 흡수 능력이 좋아 캘러스 성장량이 증가되며 장기간 보존이 가능하여 형질전환에 용이 할 것으로 보고하였다 (Zheng et al. 1999). 그러나 식물체의 재분화 혹은 형질전환

\*Corresponding author Tel 033-330-7935 Fax 033-330-7715  
E-mail kscho@rda.go.kr

효율은 식물체의 품종 또는 유전자형 (genotype)에 가장 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있으며 (Campion 1992; Bohanec and Kakse 1999; Takasaki et al. 1997) 국내 주요 재배 품종에 대한 재분화 능력에 대한 연구는 전무한 실정이다. 현재 국내 양파재배는 가을에 파종하여 봄에 수확하는 추파양파 (short-day type)와 강원 고랭지를 중심으로 봄에 파종하여 가을에 수확하는 춘파양파 (long-day type)의 두 가지 재배 작형이 있다. 이에 본 연구는 추파양파와 춘파양파의 국내 주요 재배 품종의 체세포배발생 캘러스 유도 후 현탁배양을 통한 재분화 능력을 비교 검토하였으며 재분화 식물체의 순화율 향상을 위하여 지지물의 종류와 옥신의 농도에 대한 기초 자료를 얻고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 연구에서 사용된 양파 (*Allium cepa* L.)는 추파양파인 천주대고와 창녕대고 그리고 춘파양파인 사포로끼와 만추향, 히구마 품종을 이용하였다 (Table 2). 양파의 종자를 70% 에탄올에 1분간 침지 후 5%의 차아염소산나트륨에 15분간 표면 살균 후 멸균수로 3회 세척하였다. 소독이 끝난 종자를 절단 하여 핀셋으로 배 (embryo)가 상하지 않도록 조심스럽게 적출 한 후 성장조절제가 포함된 배지에 치상하였다. 치상 배지는 0.8%의 agar 및 3%의 sucrose가 포함된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)를 이용하였고 최종 pH를 5.8로 조정 한 후 15분간 고압숙윤 멸균하였다. 배양 온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 고정하였고 1달간 암배양 후 캘러스 형태 및 유도율을 조사하였다.

### 체세포배발생 캘러스 유기 및 현탁배양

성숙배로부터 체세포배발생 캘러스를 유기하기 위하여 MS 기본배지에 2,4-D, BA 및 picloram을 단독 혹은 혼용하여 처리하였다. 유기된 체세포배발생 캘러스는 2,4-D와 BA 각 1 mg/L가 포함된 MS 액체배지에 2주 간격으로 최대 6개월까지 계대 후 현탁배양 하였으며 배양된 캘러스를 1 mg/L의 Kinetin이 포함된 1/2MS 배지에 치상하여 신초 형성율을 조사하였다.

### 식물체 재분화 및 순화율 향상

유기된 체세포배발생 캘러스로부터 Kinetin 1 mg/L를 첨가하여 신초를 유도하였다. 유도된 신초의 발근을 위해서는 1/2 MS 배지에 NAA 농도를 무처리, 0.25, 0.5 mg/L를 첨가하여 순화율을 비교하였으며 이때 한천과 vermiculite를

이용하여 식물체의 순화율을 비교하였다. Vermiculite를 이용한 순화 배지는 0.8%의 한천 배지 대신 vermiculite를 5g을 test tube에 넣은 후 7 mL의 MS 액체 배지를 넣어 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 체세포배발생 캘러스 유기 및 신초 재분화

국내 추파 양파의 대표적인 품종인 창녕대고의 성숙배를 채취하여 MS 기본배지에 성장조절제의 종류 및 농도를 달리하여 치상한 후 캘러스 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 성숙배를 치상 한 후 4주가 지나면서 표피의 전면에 캘러스가 형성되었으며 형성된 캘러스는 체세포배발생 캘러스와 비체세포배발생 캘러스로 분화되었다. 양파의 체세포배발생 캘러스는 표면이 노랑고 쉽게 깨지는 형태로 분화되는 반면 비배발생 캘러스는 반투명의 백색으로 물기가 많은 형태로 분화하였다 (Fig 2a, 2b). 일반적으로 배발생캘러스는 희고 단단하여 부서지기 쉬운 상태라고 보고되었지만 (Kim et al. 2000) 양파의 경우는 표면색이 옅은 노랑색으로 쉽게 떨어지는 형태로 나타났다. 체세포배발생 캘러스의 형성율을 조사한 결과 (Table 1), 2,4-D와 picloram을 단독으로 처리한 것이 BA의 혼합처리 보다 높았으며 2,4-D 보다는 picloram의 단독처리가 캘러스 형성율이 높아 2,4-D의 농도가 캘러스 형성에 중요한 요인으로 판단되었다. 양파의 재분화를 위해서는 MS 배지보다는 BDS 배지 (Dunstan and Short 1977)가 유리한 것으로 알려져 있으나 (Hansen et al. 1995) 본 시험에서는 배지 종류 간에는 큰 차이를 나타내지 않았다 (data not shown). 연구결과 체세포배발생 캘러스 유기 및 재분화에는 2,4-D와 BA의 농도에 많은 영향을 받았다. 이러한 결과는 leek의 캘러스 유도 및 재분화에 적은 농도의 2,4-D (0.25-0.5 mg/L)가 중요한 요인 이었다는 결과와 일치하였다 (Silvertland et al. 1996). 유기된 체세포배발생 캘러스로부터 신초를 유도하기 위하여 표 1

**Table 1.** Effect of plant growth regulators on the friable callus induction ratio from mature embryo of onion var. "Changnyoung-daego"

Plant growth regulator (mg/L)	BA		
	0	1	2
2,4-D	0	- <sup>2</sup>	-
	1	40.1	26.71
	2	31.8	18.2
picloram	0	-	-
	2.5	52.4	23.3
	5	45.5	20.3

<sup>2</sup>Not determined.

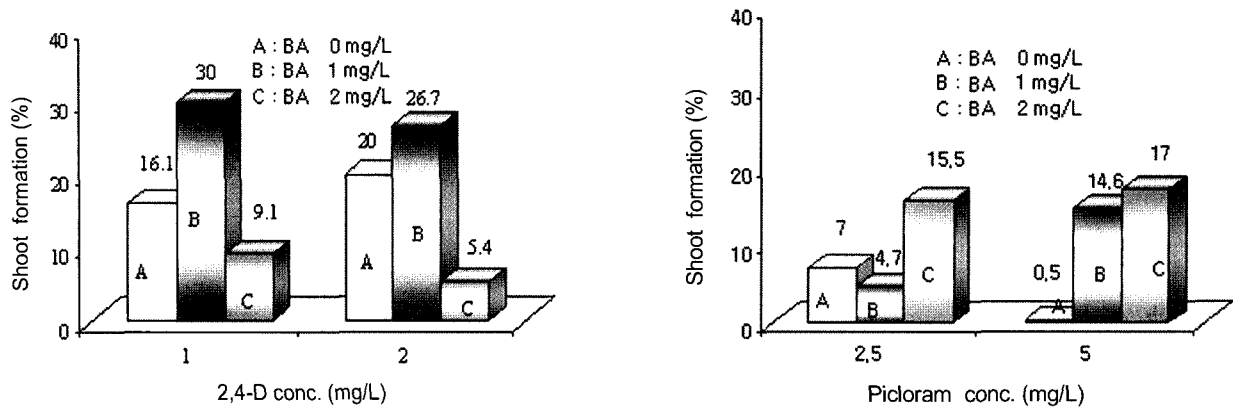


Figure 1. Shoot formation rate of callus induced at different 2,4-D, picloram and BA concentration.

에서 형성된 체세포배발생 캘러스를 Kinetin 1 mg/L가 포함된 MS 배지에 치상하여 신초 분화율을 조사하였다 (Figure 1). 신초의 재분화율은 picloram 유래 캘러스 보다 2,4-D와 BA 혼합처리로 유도된 캘러스에서 더 높았다. 일반적으로 단자엽 식물의 재분화율은 cytokinin의 첨가 시 효율이 높아지는 것으로 보고되어 (Bhaskaran and Smith 1990) 본 결과와 유사 하였다.

현탁배양을 통한 체세포배발생 캘러스 증식 및 신초형성

Auxin 단독처리로 유도된 캘러스의 재분화율을 높이고 캘러스의 증식을 위해 2,4-D와 BA가 각각 1 mg/L가 포함된 액체배지에서 2주 간격으로 최대 6개월의 현탁 배양 후에도 신초 형성율이 큰 변화가 없었다. 일반적으로 양파는 고체배지보다 액체배지에서 성장량이 많아 캘러스 증식이 용이한 것으로 알려져 있으나 재분화율은 낮은 것으로 보고되었으며 (Hansen et al. 1995; Karim and Adachi 1997) 낮은 재분화율이지만 최대 15개월까지 현탁배양을 통해 재분화가 가능하다고 보고하였다 (Van der Valk et al. 1992). 또한 Van der Valk 등 (1992)은 유기된 캘러스를 현탁배양 하면 재분화 능력이 급격하게 감소한다고 보고하였는데 본

연구에서는 6개월까지 검토한 결과 초기 재분화율을 유지 하였으며 2,4-D 단독 처리로 유기된 캘러스도 4회 연속계대 배양 시 재분화율을 회복하여 상이한 결과를 나타내었다. 이는 본 시험에서는 계대배양 초기에 이용된 캘러스를 friable callus만을 선발하였기 때문으로 생각되며 watery callus만 선발하여 현탁 및 계대배양을 시도한 후 신초의 형성율을 조사하였다. 2,4-D가 단독으로 처리되어 유기된 캘러스는 계대배양을 4회 실시 한 후에는 신초 형성율이 높아졌으나 picloram 단독 처리로 유기된 캘러스는 8번의 계대배양 후에 신초형성율이 10% 정도 증가하는 결과를 나타내었다 (Figure 3). 또한 2,4-D와 BA가 혼용 처리에서 유래된 캘러스의 경우있을 것으로 생각되었으며 6개월 이상의 장기간 현탁배양 후 재분화에 대한 검토가 필요할 것으로 판단되었다.

품종에 따른 체세포배발생 캘러스 유도

국내에서 재배되고 있는 추파양파 (short-day type) 품종 2종 (천주대고, 창녕대고)과 춘파양파 (long-day type) 품종 3종 (히구마, 만추황, 사포로끼)를 수집하여 품종에 따른 체세포배발생 캘러스 유도율을 조사하였다 (Table 2). 시험결과

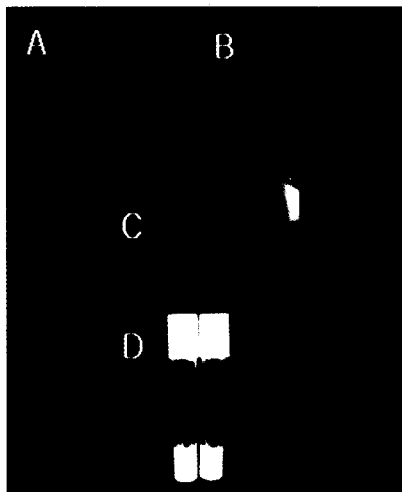
Table 2. Frequency of the callus formation from mature embryo culture of five onion cultivars in MS liquid medium containing 1 mg/L of 2,4-D and BA

Cultivars	Frequency of callus formation(%)			Source (Country)	Remark
	Friable	Watery	Total		
Sapporoki	18.5	46.5	65.0	Shippo (Japan)	Long-day type, OP <sup>1</sup>
Manchuhwang	20.2	33.6	53.8	NIHA (Korea)	Long-day type, OP <sup>2</sup>
Higuma	35.5	12.8	48.3	Takii (Japan)	Long-day type, F1 hybrid
Cheonjudaegeo	22.3	16.4	38.7	KNRDA (Korea)	Short-day type, OP
Changnyoungdaegeo	26.7	15.0	41.7	KNRDA (Korea)	Short-day type, OP

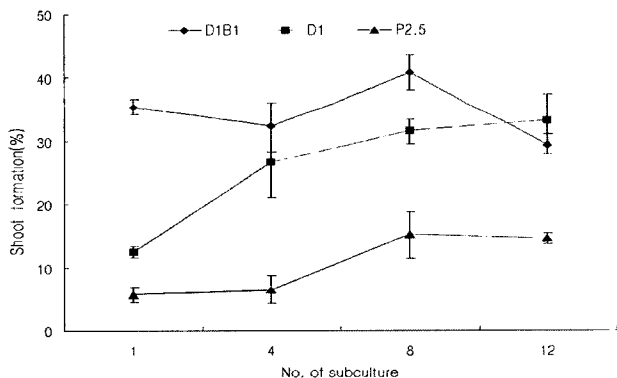
<sup>1</sup>Open pollinated variety

Shippo, Shippo Seed Company; NIHA, National Institute of Highland Agriculture; Takii, Takii Seed Company; KNRDA, KyeongsangNamdo Agricultural Research & Extension services.

전체 캘러스 유기율은 춘파양파가 추파양파보다 높았으나 friable callus type의 형성율은 비슷하였다. 또한 춘파 품종 내에서는 일대잡종 종자인 히구마가 고정종보다 낮은 결과를 나타내었으나 friable callus는 가장 높은 결과를 나타내었다 (Table 2). 품종 (genotype)은 캘러스 형성과 식물체 재분화에 가장 많은 영향을 미치는 것으로 보고되었으나 (Zheng et al. 1998; Takasaki et al. 1997) 본 실험에서는 전체 캘러스는 품종간에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 고구마의 체세포배발생 캘러스가 국내 품종간에는 큰 차이를 나타내지 않아 고구마 품종에 광범위한 식물체 재분화를 유도할 수 있다는 결과 (Kwon et al. 2002)와 비슷하며 본 연구결과 역시 양파의 국내 재배 품종에 일반적으로 적용할 수 있을 것으로 판단되었다.



**Figure 2.** Somatic embryogenesis of Onion (*Allium cepa* L.). A, Embryogenic callus (friable-type callus); B, Non-embryogenic callus (watery-type callus); C, Shoot regeneration from somatic embryo on MS basal medium containing 1 mg/L of Kinetin; D, Somatic embryo-derived plantlets on 1/2MS basal medium.



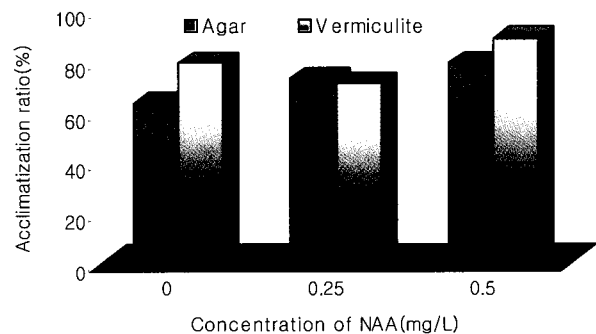
**Figure 3.** Effect of number of subculture in MS liquid medium containing 1 mg/L of 2,4-D and BA on shoot formation from callus induced at different 2,4-D, picloram and BA. D1B1, 2,4-D and BA 1 mg/L; D1, 2,4-D 1 mg/L; P2.5, 2.5 mg/L Picloram.

최적순화 체계

양파의 성숙배를 이용하여 체세포배발생 캘러스를 유도하여 완전한 식물체를 얻었다 (Figure 2). 조직배양을 통해 재분화된 유식물체는 순화 단계에서 고사되는 경우가 많고 기존의 한천 배지에서 바로 기외 용토로 옮기는 것은 한천을 제거하는 번거로움이 있다. 또한 기내에서 형성된 뿌리는 순화과정 중에 유식물체의 생장에 중요한 역할을 담당하고 있으나 이식작업 과정 중에 뿌리를 꺼내고 미생물 증식 방지를 위해 한천을 씻는 동안 뿌리에 많은 손상을 입게 되어 순화율이 낮아진다 (Kuneman and Albers 1992). 따라서 기내에서 형성된 뿌리를 세척하지 않도록 기내의 발근 과정에서 지지물을 기외 순화 용토와 같은 vermiculite를 이용하였으며 기존의 한천을 이용한 것과 비교하였다 (Figure 4). 그 결과 순화율은 지지물로 한천을 사용한 것보다 vermiculite를 이용했을 때 높았으며 특히 성장조정제 NAA를 0.5 mg/L 첨가한 배지에서 89%로 가장 높은 순화율을 나타냈다 (Figure 5). 이는 한천의 경우 이식과정에서 뿌리의 손상에 의해 순화율에 영향을 미친 것으로 생각되며 Yoon등 (2001)이 발표한 카사바의 순화단계에서 뿌리에 전혀 손상을 입히지 않고 토양에 이식할 경우 94%의 생존율을 보인 것과 같은 결과이다. 따라서 양파와 같이 기내



**Figure 4.** Photograph of regenerated onion just before acclimatization into greenhouse. A, plantlets grew on agar (0.8%) medium; B, Plantlets in vermiculite contains 1/2MS liquid medium and 0.25 mg/L of NAA.



**Figure 5.** Effect of NAA concentration, agar and vermiculite on the acclimatization of regenerated plant from the embryogenic callus derived from mature embryo of onion (*A. cepa* L.).

뿌리 발달이 적은 작물의 경우 토양이식 전단계의 발근 배지의 지지물을 한천보다 vermiculite를 이용하는 것이 뿌리의 손상정도나 경제적인 측면에서 유리할 것으로 판단되었다.

## 적 요

양파의 재분화 체계 확립을 위해 성숙된 양파의 종자로부터 성숙배를 적출한 후 2,4-D와 BA의 다양한 농도를 이용하여 체세포배발생 캘러스의 형성율을 조사하였다. 체세포배발생 캘러스는 쉽게 부서지는 특성을 가지고 있었으며 비체세포배발생 캘러스는 물기를 많이 포함하고 있어 쉽게 구분이 가능하였다. 체세포배발생 캘러스는 picloram 2.5 mg/L 또는 5 mg/L가 단독으로 포함된 MS배지를 이용하여 25℃ 암배양 4주 후 가장 높은 유도율을 나타내었다. 그러나 유도된 캘러스를 shoot로 재분화 시킨 결과 2,4-D와 BA 1 mg/L가 혼합된 처리구에서 가장 높은 shoot 유기율을 나타내었다. 따라서 다른 처리에서 유도된 캘러스를 2,4-D와 BA 1 mg/L가 포함된 액체배지에 현탁배양을 시도하였다. 현탁배양은 캘러스의 증가 뿐만 아니라 캘러스의 cell cycle을 synchronized 함으로서 이후 형질전환이 용이할 것으로 판단되었다. 현탁 배양된 캘러스는 Kinetin 1 mg/L가 포함된 1/2MS 배지에서 60일간 광배양 하여 shoot 유기하였으며 유도된 shoot는 NAA 0.5 mg/L가 포함된 발근배지에서 발근 후 순화하여 완전한 식물체로 재생할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 인용문헌

- Bhaskaran B, Smith RH (1990) Regeneration in cereal tissue culture; a review. *Crop Sci* 30: 1328-1336
- Bohanec B, Kakse M (1999) Variation in gynogenic response among long-day onion accessions. *Plant Cell Rep* 18: 737-742
- Campion B (1992) Advances in haploid plants induction in onion through *in vitro* gynogenesis. *Plant Sci* 86: 97-104
- Dommissse EM, Leung DWM, Shaw ML, Connner AJ (1990) Onion is a monocotyledonous host for *Agrobacterium*. *Plant Sci* 69: 249-257
- Dunstan DI, Short KC (1977) Shoot production from the flower head of *Allium cepa* L. *Scientia Hort* 10: 345-365
- Eady CC, Lister CE, Suo Y, Schaper D, Suo YY (1996) Transient expression of *uidA* constructs in *in vitro* onion culture following particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Plant Cell Rep* 15: 958-962
- Hansen EE, Hubstenberg JF, Phillips GC (1995) Regeneration of shoots from cell suspension-derived protoplasts of *Allium cepa*. *Plant Cell Rep* 15:8-11
- Jeong HB, Prak HG (1997) Plant redifferentiation and *in vitro* multiplication of onion by shoot primodium culture. *J Kor Soc Hort Sci* 38: 123-128
- Karim MA and Adachi T (1997) Cell suspension, isolation and culture of protoplasts of *Allium cepa*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 51: 43-47
- Keller J (1990) Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion. *Euphytica* 47: 241-247
- Kim MD, Kim JC, Jin CD, Han TJ (2000) Plant regeneration from protoplasts of suspension cultured cells in *Arabidopsis thaliana*. *Korean J Plant Tiss Cult* 27: 125-131
- Kunneman BPAM, Albers MRJ (1992) Effects of tissue culture and acclimatization conditions on the survival and growth of rooted and unrooted *Mallus and Pyrus* micro-cutting. *Acta Hort* 314: 147-154
- Kwon EJ, Kwon SY, Kim MZ, Lee JS, Ahn YS, Jeong BC, Kwak SS, Lee HS (2002) Plant regeneration of major cultivars of sweetpotato in Korea via somatic embryogenesis. *Korean J Plant Tiss Cult* 29: 189-192
- Ministry of Agri. and Forestry, Korea (2003) Crop's statistics
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-479
- Silvertland B, van Rooyen A, Lavrijsen P, van Harten M, Jacobsen E (1996) Plant regeneration *via* organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultured derived from mature zygotic embryos of leek (*Allium ampeloprasum* L.) *Euphytica* 91: 261-270
- Takasaki TK, Hatakeyama K, Ojima M, Watanabe M, Toriyama K, Hinata (1997) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica rapa* L. *Breed Sci* 47: 127-134
- Van der Valk P, Scholten OE, Verstappen F, Jansen RC, Dons JJM (1992) High frequency somatic mebrogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus culture of three *Allium* species. *Plant Cell Tiss Org Cult* 30: 181-191
- Yoon S, Cho DY, Soh WY (2001) Effects of excising *in vitro*-formed roots on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Korean J Plant Tissue Culture* 28: 103-108
- Zheng SJ, Henken B, Sofiari E, Jacobsen E, Kik C, Krens F (1998) Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 53: 99-105
- Zheng SJ, Henken B, Sofiari E, Keizer P, Jacobsen E, Kik C, Krens F (1999) Effect of cytokinins and lines on plant regeneration from long-term callus and suspension culture of *Allium cepa* L. *Euphytica* 108: 83-90

(접수일자 2004년 12월 9일, 수리일자 2005년 1월 29일)