

파(*Allium fistulosum* L.)의 자방배양으로 부터 화아발생 및 꽃의 분화

김재훈* · 최용의¹ · 소응영¹

생명공학연구소 식물생화학 Research Unit, ¹전북대학교 자연과학대학 생물과학부

Flower Bud Induction and Flower Regeneration from Ovary Cultures of *Allium fistulosum* L.

KIM, Jae-Whune* · CHOI, Yong-Eui¹ · SOH, Woong-Young¹

Plant Biochemistry Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea; and ¹Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea. *Corresponding author.

Flowergenic callus was induced from the ovary surface of *Allium fistulosum* L. cultured on MS medium containing 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA or 0.5 mg/L kinetin. After 3-4 weeks of culture, the flower buds were developed from flowergenic callus. The continuous production of flowergenic callus was proliferated, when subcultured on the medium containing 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L kinetin. However, frequency of flower bud formation from flowergenic callus was decreased as the subculture was repeated. Histological observation reveals that the developmental pattern of flower bud from flowergenic callus was closely similar to that of natural flowers.

Key words: flowergenic callus, growth regulators, histological observation

식물조직의 기내배양을 통한 화아유도에 대한 연구는 화아발생과정의 조절기작을 이해하는데 중요한 수단이 될 수 있다. 기내배양에 의한 화아발생은 배양재료의 부위 또는 그 재료가 지니는 생리적인 상태 등에 따라 크게 좌우될 수 있고, 광주기, 온도 등의 배양환경과 성장조절물질 등의 배지조성에 크게 영향을 받는다는 보고가 있다(Tanimoto and Harada, 1981; Shinozaki and Tanimoto, 1982; Kaur-Sawhney et al., 1988; Vander Krieken et al., 1988; Smulders et al., 1990). 기내배양에서 화아가 유도되는 것은 방법에 따라 몇 가지로 구분할 수 있는데, 즉 배양조직편으로부터 일단 캘러스가 유도되면서 이로부터 화아가 발생하는 경우(Raste and Ganapathy, 1970; Jayakar, 1970), 배양조직 자체로부터 직접 화아가 기원되는 경우(Narasimhuiu and Reddy, 1984), 부정아의 원기가 먼저 형성된 후 이들 부정아가 화아로 전환되는 경우(Liu and Li, 1989; Lee et al., 1991), 그리고 기내배양을 통해 얻어진 부정아나 체세포배로부터 재분화된 식물체로부터 기내에서 꽃을 유도하는 방법(Tanimoto and Harada, 1981; Rajasekaran et al., 1983) 등으로 구분할 수 있다. 그런데 이와 같은 기내 조직배양에 의한 화아유도는

담배, 오이 및 토마토 등 대부분이 쌍자엽식물을 중심으로 보고되었고, 단자엽식물에서의 화아유도는 연구보고가 별로 되어 있지 않다. 또한, 조직배양 재료에서 화아발생 캘러스가 유도된 후 이 캘러스로부터 화아 및 꽃을 대량으로 만드는 연구는 아직까지 수행되지 못했다.

본 실험에서는 단자엽식물인 파의 자방배양을 통하여 화아발생 캘러스를 유도하여, 화아발생능을 유지하면서 이들로부터 화아가 발생하는 과정에서 여러 성장조절물질의 영향을 구명하였다. 또한 기내배양에서의 화아발생과정에 있어서 외부형태 및 조직학적 관찰을 시도하였다.

재료 및 방법

배양 재료 및 조건

파(*Allium fistulosum* L.)의 꽃대가 나온 후 10일째의 총포를 95% 알코올로 1분간 표면을 살균한 후 절개하여 총포내의

균일한 화기로부터 지방만을 절취하여 배양재료로 사용하였다(Kim and Soh, 1993). 배지조성은 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에 3% sucrose, 0.8% 한천을 첨가한 후 성장조절물질로 auxin (2,4-D, NAA), cytokinin (BAP, kinetin) 과 GA₃를 농도별로 조합 처리한 다음 pH를 5.8로 조정하고, 이들을 121°C, 1.2 기압으로 10분간 습열멸균한 후 유리 petridish (120 x 20 mm)에 각각 40 mL씩 분주하였다. 절취된 지방을 여러 조건의 MS배지에 각각 20개씩 이식하여 3-4주 후 화아발생 캘러스의 유도율을 조사(5번 반복 실시)하였다. 배양환경은 온도 25±1°C, 12 μmol m⁻²·s⁻¹의 조명이래에서 16 시간 그리고 암소에서 8 시간 주기로 배양하였다.

화아 유도 및 조직학적 관찰

유도된 화아발생 캘러스를 같은 조건의 배지에 계대배양을 실시하여 3-4주 후 캘러스의 유지 및 화아의 발생률을 관찰하였다. 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L kinetin이 첨가된 MS 배지에서 계대배양한 화아를 해부학적으로 관찰하기 위해 화아의 발생 시기별로 재료를 채취하여 FAA에 48 시간 고정시킨 후 n-butyl alcohol 저농도에서 고농도로 옮겨 주면서 탈수 과정을 거쳤다. 이어서 파라핀 매몰과정을 거쳐 회전식 마이크로톰으로 10 μm로 절단하여, hematoxylin 과 light green으로 이원염색한 후 영구조직표본을 만들어 광학현미경하에서 관찰하였다.

결 과

과의 지방을 여러 성장조절물질이 첨가된 MS 배지에 배양하였을 때 주로 지방의 밑부분에서 화아발생 캘러스가 유도되었다(Figure 1A). 캘러스는 꽃대가 나온 후 10일 경과한

Table 1. Effects of growth regulators in induction of flowergenic callus from ovary cultures of *Allium fistulosum* L.

| Growth regulators (mg/L) | | | | | Induction of flowergenic callus (%) ^a |
|--------------------------|-----|-----|---------|-----------------|--|
| 2,4-D | NAA | BAP | Kinetin | GA ₃ | |
| 0.5 | | | | | - ^b |
| 1.0 | | | | | - |
| | 0.5 | | | | - |
| | 1.0 | | | | - |
| 0.5 | | 0.5 | | | 30 |
| 0.5 | | | 0.5 | | 45 |
| 0.5 | | | | 0.5 | - |
| | 0.5 | 0.5 | | | 75 |
| | 0.5 | | | 0.5 | 55 |
| | 0.5 | | 0.5 | | - |
| | | 0.5 | | | 20 |
| | | | | 0.5 | 10 |
| | | | | 0.5 | - |

^aThe total number of explants: 100(20 x 5).

^bNon flowergenic callus.

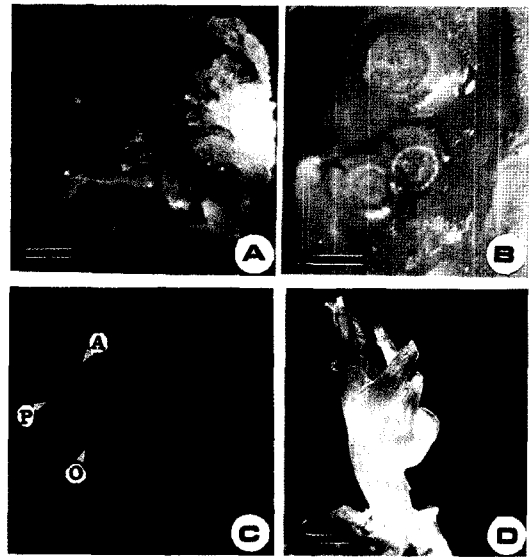


Figure 1. Flowergenic callus induction and flower development from ovary cultures of *Allium fistulosum* L. A. Flowergenic callus (arrowheads) formed from the epidermis of ovary after 4 weeks of culture. B. Flower buds (arrowheads) developed from flowergenic callus. C. Normal flower with ovary (O), anther (A) and petal (P) formed in cultures with 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L kinetin concentrations. D. Abnormally developed flower by long term cultures, and the arrowheads point to the petals. Bars = 5 mm.

화기의 지방을 사용하였을 때 잘 유도되었고, 꽃대가 나온 지 10일 이전 또는 이후일 때의 지방을 사용하였을 때는 화아가 거의 유도되지 않았다(자료 미제시). 화아발생 캘러스는 cytokinin (BA, kinetin) 단독배지 및 auxin과 조합된 배지에서 발생되었는데, 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA (75%) 또는 0.5 mg/L kinetin (55%)이 첨가된 배지에서 양호하였다(Table 1). 그러나 auxin (NAA, 2,4-D)과 GA₃의 단독배지에서는 화아발생 캘러스가 형성되지 않았다(Table 1).

화아발생 캘러스로부터 화아의 기원은 먼저 캘러스 표면이 왕성하게 분열하여 이상비대생장이 일어난 후 중앙이 움모양으로 돌출되고, 바깥쪽은 동심원의 화판이 생기는 전형적인 꽃의 초기 형성과정의 특징을 나타냈다(Figure 1B). 화아발생 캘러스로부터 발생한 화아의 수는 BA 첨가배지에서 계대배양하였을 때 많이 형성되었고, kinetin이 첨가된 배지에서는 화아의 수가 BA 첨가배지보다 적었다. 그러나 BA 첨가배지에서 집단적으로 유도된 화아는 화분 및 배주가 발달하지 않은 비정상적인 것이 대부분이고, 성숙되는 화아는 극히 소수에 불과하였다. 이에 반해 kinetin 첨가배지에서 유도된 화아는 수술, 심피 및 배주의 형태가 완전히 갖추어진 꽃으로 성숙되었다(Figure 1C).

한편 화아발생 캘러스를 계대배양할 경우에는 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L kinetin이 첨가된 배지에서만 3회 이상 계대배양할 때까지도 캘러스의 화아발생능이 유지되고 이로

Table 2. Effects of growth regulators on flower bud formation and flowergenic callus maintenance by subculture at 3-4 week intervals.

| Growth regulators (mg/L) | | | | Subculture times | | |
|--------------------------|-----|-----|---------|------------------|---|---|
| 2,4-D | NAA | BAP | Kinetin | 1 | 2 | 3 |
| 0.5 | | 0.5 | | +a | - | - |
| | | | | - | - | - |
| 0.5 | | | 0.5 | + | - | - |
| | | | | - | - | - |
| | 0.5 | 0.5 | | + | - | - |
| | | | | + | - | - |
| | 0.5 | | 0.5 | ++ | + | - |
| | | | | ++ | + | + |

^aflower buds : --: 0%, -: 1-10%, +: 10-25%, ++: 25-50%.
flowergenic callus

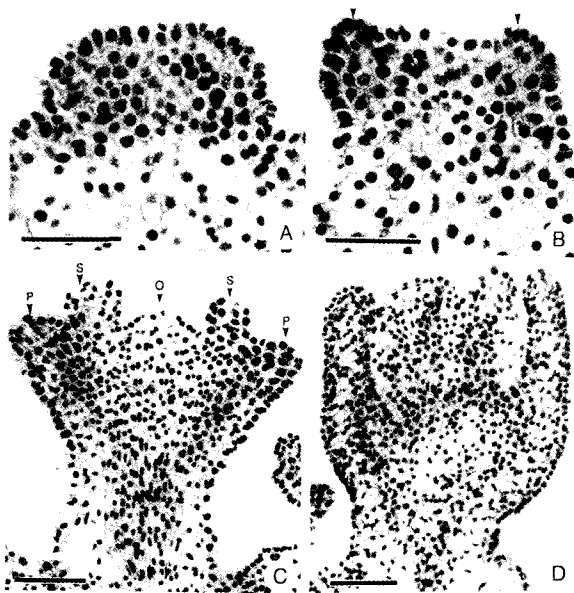


Figure 2. Histological observation of flower bud development. A. An apical dome formation from surface of flowergenic callus. B. Petal primordia (arrowheads) initiated from an outside whorl of flower bud. C. Ovary (O), stamen (S) and petal (P) developed from the inner and outside whorls of flower bud. D. Mature flower. Bars = 5 mm.

부터 화아가 발생되었다(Table 2). 이들 이외의 조건에서는 계대배양을 거듭할수록 화아의 발생 및 유지능이 현저하게 감소하고, 기관분화능(부정아 또는 부정근) 캘러스가 유도되었다. 특히 2,4-D와 BA가 첨가된 배지에서는 화아 발생률이 현저하게 감소하였다(Table 2). 또한, 배양기간이 길어지거나 계대배양을 거듭할수록 화기의 형태를 완전히 갖춘 정상적인 꽃이 유도되는 것보다 수술과 배주 등이 생기지 않고 화편만이 비후된 비정상적인 형태의 꽃이 유도되었다(Figure 1D).

화아 발생의 해부학적 관찰결과, 초기에는 화아발생 캘러스의 표면에서 분열이 왕성하게 일어나 돛형의 분열조직이 발생하였다(Figure 2A). 화아분열조직은 양쪽 가장자리에서

분열이 먼저 활발히 이루어져 화편의 기원부위가 형성되고, 중앙이 함몰되는 형태를 이루었다(Figure 2B). 이어서 양쪽 가장자리에서 화편이 형성되고, 중앙에서는 심피와 배주가 기원되었다(Figure 2C). 화아는 화편, 수술, 심피 및 배주가 발달되면서 완전한 꽃의 형태를 갖추었다(Figure 2D).

고 찰

본 연구에서 화아발생 캘러스의 유도에는 cytokinin (BA, kinetin)이 필수적이었고, auxin (2,4-D, NAA)을 조합처리한 경우 화아발생 캘러스의 유도율이 증가되었다(Table 1). 그러나 auxin 단독배지에서는 화아가 발생되지 않아, auxin이 화아발생 캘러스를 유도하는 것이 아니고, 단지 촉진적인 효과를 준 결과라고 사료된다. 또한, GA₃ 단독 및 auxin과 조합의 경우에도 화아가 전혀 형성되지 않았는데, 이는 auxin이 화아발생에 필수적이라는 연구결과(Tanimoto and Harada, 1981)와 상반되었지만, cytokinin이 화아의 발생을 촉진시킨다는 견해(Narasimhuu and Reddy, 1984; Kaur-Sawhney et al., 1990)와는 일치되었다.

일반적으로 기내에서 화아발생은 생장조절물질의 종류와 사용된 식물재료의 생리적인 상태에 따라 크게 달라진다고 알려져 있다(Wardell and Skoog, 1969). 또한, 화아의 형성은 생식생장으로 전환될 때의 식물재료에서 쉽게 이루어지며, 같은 화경일지라도 화아의 발생과 부정아의 발생률이 부위에 따라 현저히 달라질 수 있다(Tran Thanh Van, 1973). 본 연구에서도 꽃대가 나온지 10일을 전후로 하여 화아를 쉽게 유도할 수 있는 시기가 있는 반면, 화아가 전혀 유도되지 않고 부정아나 체세포배(Kim and Soh, 1993, 1996)가 유도되었다. 이와 같은 결과는 꽃대가 나온지 10일된 파의 지방은 높은 화아발생 상태에 있고, 이 시기 이외에는 화아발생능이 매우 낮아 화아가 유도되지 않고, 부정아와 체세포배가 유도되는 것으로 사료된다. 따라서 파의 지방 발달 시기 별로 화아 발생률을 조사해야 할 필요가 있다. 또한, 배양재료의 생리적인 상태에 따라 화아의 유도율이 크게 달라지기 때문에 배양재료의 정확한 생리적 특징의 연구가 요구된다(Tiburcio et al., 1988; Kaur-Sawhney et al., 1990).

일부 식물에서는 화경이나 줄기의 절편을 재료로 하여 배양한 경우 화아와 부정아가 함께 발생되고, 3회의 계대배양까지는 화아의 발생이 계속될 수 있었지만 더 이상의 계대배양에서는 급격히 화아발생이 떨어졌다(Chaila et al., 1975). 본 연구에서도 처음 유도된 화아발생 캘러스에서는 정상적인 화아가 많이 발생되었지만, 배양기간이 길어지거나 계대배양을 거듭할수록 비정상적인 형태의 꽃의 발생이 증가하였다. 이와 같은 결과는 지방내에 화아를 유도하는 어떤 물질이 있으나 계대배양이 거듭됨에 따라 이 물질이 희석되거나 없어져 화아유도능이 소실된 것으로 사료된다.

따라서 화아를 캘러스로부터 직접 발생시킬 경우에는 주로 화아의 성숙이 쉽게 이루어지지 않는다는 단점(Raste and Ganapathy, 1970)의 한 원인이라고 생각한다.

조직배양에 의한 정상적인 화아의 발생은 기관 및 체세포 배 등의 분열조직으로부터 변화된 화아에서 만이 완전히 성숙된 꽃으로 발달될 수 있다는 결과(Hughen, 1980: McDaniel et al., 1991)와 달리 본 연구에서는 자방으로부터 화아발생 캘러스를 유도하고, 이들로부터 성숙한 꽃을 얻을 수 있었다. 따라서 이와 같은 화아발생 캘러스의 유도방법은 아직까지 밝혀지지 않은 화아발생에 관여하는 여러 요인들에 대한 해명에 유용한 수단이 될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

파(*Allium fistulosum* L.)의 자방을 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 또는 0.5 mg/L kinetin을 조합처리한 MS배지에서 배양하였을 때, 자방의 표면으로부터 화아발생 캘러스가 유도되었다. 화아발생 캘러스의 유지는 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L kinetin이 첨가된 배지에서 계대배양 하였을 때 양호하였다. 배양 3-4주 후 화아들은 화아발생 캘러스로부터 형성되었지만, 계대배양을 거듭할수록 화아의 발생률이 감소하였다. 화아의 발생 단계별 조직학적 관찰 결과 동형의 분열조직이 넓게 퍼지면서 자연상태의 꽃과 같이 외측에 화판, 내측에 심피와 배주가 기원된 후 성숙한 꽃으로 발달하였다.

사사 - 원고에 세심한 조연을 해준 생명공학연구소의 박 상수 박사과 이 행순 박사에게 감사한다.

인 용 문 헌

- Chaila MKH, Aksenova NP, Konstantinova TN, Baverina TV (1975) Proceedings of the Royal Society Series B 190: 133-340
- Hughen AM (1980) The regulation of tobacco floral organ initiation. Bot Gaz 141: 389-395
- Jayakar M (1970) In vitro flowering of *Crepis capillaris*. Phytomorphology 12: 410-412
- Kaur-Sawhney R, Kandpal G, McGonigle B, Galston AW (1990) Further experiments of wisconsin 38 tobacco. Planta 181: 212-215
- Kaur-Sawhney R, Tiburcio AF, Galsto AW (1988) Spermidine and flower bud differentiation in thin-layer tobacco tissue cultures. Planta 173: 282-284
- Kim JW, Soh YW (1993) Somatic embryogenesis in floral organ cultures of *Allium fistulosum* L. Korean J Plant Tissue Culture 20: 227-232
- Kim JW, Soh YW (1996) Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension culture of *Allium fistulosum* L. Plant Sci 114: 215-220
- Lee HS, Lee KW, Yang SG, Liu JR (1991) In vitro flowering of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) zygotic embryos induced by growth regulators. Plant Cell Physiol 32: 1111-1113
- Lui KB, Li SX (1989) In vitro flower formation in leaf explants of tomato; effect of NaCl. Planta 180: 131-133
- McDaniel CN, King RW, Evans LT (1991) Floral determination and in vitro floral differentiation in isolated shoot apices of *Lolium temulentum* L. Planta 185: 9-16
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Narasimhuu SB, Reddy GM (1984) In vitro flowering and pod formation from cotyledons of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Theoretical and Applied Genetics 69: 87-91
- Rajasekaran K, Mullins MG, Nair Y (1983) Flower formation in vitro by hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Annals of Botany 52: 417-420
- Raste AP, Ganapathy PS (1970) In vitro behaviour of inflorescence segments of *Mazus pumilus*. Phytomorphology 12: 367-374
- Shinozaki M, Takimoto A (1982) The role of cotyledons in flower initiation of *Pharbitis nil* at low temperatures. Plant Cell Physiol 23: 403-408
- Smulders MJM, Visser EJW, Croes AF, Wullems GJ (1990) The dose of 1-naphthaleneacetic acid determines flower-bud regeneration in tobacco explants at a large range of concentrations. Planta 180: 410-415
- Tanimoto S, Harada H (1981) Effects of IAA, zeatin, ammonium nitrate and sucrose on the initiation and development of floral buds in *Torenia* stem segments cultured in vitro. Plant Cell Physiol 22: 1553-1560
- Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R and Galston AW (1988) Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue culture. Plant Cell Physiol 29: 1241-1249
- Tran Thanh Van M (1973) Direct flower neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. Planta 115: 87-92
- Vander Krieken WM, Croes AF, Barendse GWM, Wullems GJ (1988) Uptake and metabolism of benzyladenine in the early stage of flower bud development in vitro in tobacco. Physiol Plant 74: 113-118
- Wardell WL, Skoog F (1969) Flower formation in excised tobacco stem segments; I. Methodology and effects of plant hormones. Plant Physiol 44: 1402-1406

(1998년 4월 9일 접수)