

마늘의 Callus 培養에 關한 研究

張茂雄* · 李甲郎** · 曹秀悅** · 鄭熙敦***

Studies on the Callus

Chang, Moo Ung*, Kap Rang, Lee**, Soo Yeul, Cho**, Hee Don, Chung***

Abstract

The experiment was conducted to culture callus tissue induced from foliage leaf of garlic bulb for the production of virus-free stocks and for the reduction of expenses for seeds, The following results were reached.

1. Linsmaier-Skoog basal medium containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 10^{-5} M and benzyladenine 10^{-5} M showed the most effective for the inductive for the induction of garlic callus.
2. The growth rate of callus was the highest in Linsmaier-Skoog basal medium containing kinetin 10^{-6} M and 2,4-D 10^{-6} M.
3. The results of periodical assay of virus concentration in callus tissues showed that virus was almost eliminated by repeated transfer of translucent and soft tissue for eight generations.
4. When virus-free garlic callus tissues were transferred to Murashige-Skoog basal medium containing kinetin 10^{-6} M and naphthaleneacetic acid 5×10^{-6} M, the tissues were redifferentiated and formed plantlet.

緒 論

마늘은 우리나라의 四大菜蔬中의 하나로서 必須調味料으로써 뿐만 아니라 獨特한 藥理作用 등으로 인하여 國內外的으로 消費量이 급격히 늘어나고 있으며 이에 따른 栽培面積도 크게 증가하고 있는 實情이다¹⁾.

마늘 모자이크병의 病原바이러스로써 國內에서는 羅²⁾가 garlic mosaic virus로 絲狀粒子(1,200~1,250nm)를 報告하였고, 鄭·張³⁾은 2種의 바이러스(S-type와 L-type)를 분리하여, L-type은 potyvirus에 속하는 garlic mosaic virus로, S-type은 carlavirus에 속하는 garlic latent virus로 報告하였다. 國外에서는

onion yellow dwarf virus⁴⁾, tobacco rattle virus⁵⁾ garlic latent virus⁶⁾, garlic mosaic virus⁷⁾가 알려져 있다.

마늘은 營養繁殖에 依해서만 增殖되므로 일단 바이러스 感染이 되면 繼代的으로 罹病된 마늘을 生産하게 되고 感染度의 增加와 種球의 退化로 인하여 마늘의 生長이 不良하고, 品質이 떨어지며 收量이 減少된다는 事實이 報告되어 있다^{2),4),9),10)}.

마늘은 같은 量의 生産을 위해서는 적어도 20%는 種球로서 利用되어야 하는데, 이때 健全한 種球는 增收의 가장 큰 요인이 된다고 한다^{6),9),10)}.

그러서 近年에 와서 世界各國의 마늘栽培地에서 바이러스 無感染 種球의 生産을 目的으로 마늘組織培養

* 嶺南大學校, 生物學科 Dept. of Biology, Yeungnam University, Gyeongsan, 632, Korea.

** " 食品營養學科 Dept. of Food & Nutrition, "

*** " 園藝學科 Dept. of Horticulture, "

本 研究는 1979年度 產學協同財團 學術研究費 文授에 依한 것임.

및 callus培養에 對한 研究가 활발하게 進行되고 있는 실정이다⁹⁾¹¹⁾.

우리나라에서도 李⁸⁾, 蘇^{12),13)} 등이 바이러스 無感 染 마늘 種球의 生産을 目的으로 마늘 組織培養에 關해 報告한바있다.

本 實驗에서는 바이러스 無感 染株를 보다 効率의 으로 育成하는 方法을 검토하기 爲해 마늘의 生長點이 지닌 普通葉 由來의 callus培養을 行하여 많은 培養細 胞를 增殖시키고, 여기서 얻은 바이러스 無感 染 callus 組織을 利用하여 再分化培養基에 移殖하여 바이러스 無 感 染의 小植物이 形成되었기에 그 結果를 報告한다.

材料 및 方法

1. 마늘조직

本 實驗에 이용한 마늘은 두 종의 마늘바이러스에 혼합감염이 확인된 義城地方의 在來種 마늘로서 1978 年 6월에 수확하여 低溫處理에 依해 休眠을 타파한 것 을 이용했으며, 마늘인편을 0.1% 승홍수와 70% ethyl alcohol로 殺菌後, 普通葉의 中下部를 취하여 callus誘 導用으로 사용하였다.

Table 1. Composition of Linsmaier-Skoog basal medium for *Allium sativum* L

		mg/L	
NH ₄ NO ₃	1650	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
KNO ₃	1900	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
H ₃ BO ₄	6.2	KH ₂ PO ₄	0.17
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Na ₂ EDTA	37.3
KI	0.83	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	Myo-inositol	100
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	Thiamine-HCl	0.1
		Final pH	5.6

Table 2. Effect of growth regulators on the induction of garlic callus.

BA(M)	none	NAA				2,4-D				IAA			
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁷	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁶	T	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁵	TT	-	+	±	-	≡	≡	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Degree of callus formation;

-no, ±poor, +fair, ≡good, ≡≡excellent

T: thickening

2. callus誘導用培地

本 實驗에서 사용한 callus誘導用 基本培地는 Linsmaier and Skoog RM(1964) 培地를 使用하였으며 (Table 1), 여기에 Benzyladenine 10⁻⁴~10⁻⁷ M 및 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (α-naphthalene acetic acid), IAA (indole-3-acetic acid)를 各各 10⁻⁴~10⁻⁷M을 組合한 것에 sucrose 3%와 agar 1.5~2%를 첨가하여 使用하였다.

3. callus組織의 生長 및 繼代培養

誘導된 callus組織을 增殖시키기 爲하여 가장 투명한 新 callus 組織과 갈색의 callus組織을 各各 분리하여 無菌의 으로 일정량(1g)씩 移殖하여 25일간 2°C에서 培養하면서 5일 간격으로 측정하여 증식된 生體重量으로 표시하였다. 繼代培養은 移殖日로부터 增殖量이 最大值에 달하였을 때를 한세대로 하였다.

4. callus組織에서 바이러스의 檢定

callus組織內의 바이러스의 濃度는 局部病斑을 形成하는 *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*를 檢定植物로 使用하여 生物檢定을 行하였다. 이들 植物은 26°C의 온실에서 키웠고, 살충제를 使用하여 곤충의 發生을 방제하였다. 接種 3일전에 완전히 전개된 上葉 3枚를 接種葉으로 使用하였다.

Callus組織의 繼代培養은 各 callus의 가장 투명하고 부드러운 部分을 취하여 8代까지 하였고, 各代의 callus 中에서 투명한 部分과 갈색부분을 취하여 接種源으로 하였다.

汁液接種은 接種源에 인산완충액(0.01M, pH 7.0)을 1:5(W/V)의 비율로 加하여 磨碎, 搾汁한 다음 carborandum을 使用하여 常法으로 行하였다.

5. callus組織으로부터 小植物로 再分化

바이러스가 除去된 callus組織은 적당량 취하여 cytokinin類(kinetin, Benzyladenine)과 auxin類(2,4-D

NAA, IAA)를 함유한 培地에 移植한 후 10cm 위에 10W의 형광등을 장치하여 光線을 쬐이면서 1~2個月 間 培養시켜 小植物로 再分化시켰다.

結果 및 考察

1. callus誘導條件

마늘인편의 보통엽 조직에서 callus를 유도하기 위하여 Linsmaier and Skoog 基本培養地에 auxin類로서 2,4-D, IAA, NAA, cytokinin類로서 kinetin과 Benzyladenine(BA)을 농도별로 組合하여 첨가한 培養地에 移植한 결과 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 BA 단독처리구와 auxin類인 2,4-D, IAA, NAA의 단독 처리구는 callus가 形成되지 않았거나 微細현상만, 관찰되었지만 BA와

2,4-D의 혼합처리구에서는 callus 유도상태가 다른것에 비하여 양호하였으며,

특히 그들 중에서 BA 10^{-5} 와 2,4-D 10^{-6} M를 함유한 것이 가장 양호하였다.

cytokinin類中 BA이외의 kinetin은 여러농도별로 처리하여 보았으나 callus유도가 불량하였다. 이와 같이 얻어진 callus組織을 callus유도용培地인 BA와 2,4-D를 함유한 培養基에 移植하여 培養한 結果, 培養 20日 後부터는 callus組織이 차츰 赤變現象이 일어나고, 增殖狀態가 차츰 不良하여졌기 때문에 callus組織의 生長에는 不適當하다고 추측되었다.

2. callus組織의 生長條件 및 繼代培養

誘導된 callus組織을 生長시키는 最適條件을 조사하기 위하여 各種植物 호르몬의 농도별로 處理한 培地에 移植하여 生長狀態를 조사한 結果 Table 3과 같은 結

Table 3. Effect of growth regulators on the growth of garlic callus

Kinetin (M)	none	2,4-D				NAA				IAA			
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	≡	≡	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	+	+	-	-	±	-	-	-	±	-	-
10^{-4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Degree of growth;

-no, ≡poor, +fair, ≡good, ≡excellent



Fig. 1. Garlic callus grown on the Linsmaier-Skoog basal medium containing 2,4-D 10^{-6} M and kinetin 10^{-6} M.

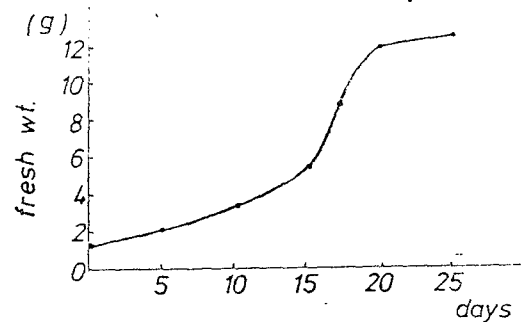


Fig. 2. Time course of garlic callus growth in the L&S medium containing kinetin (10^{-6} M) and 2,4-(10^{-6} M)

果를 얻었다.

callus組織의 生長은 kinetin 10^{-6} M과 2,4-D 10^{-6} M을 함유한 培地에서 가장 良好한 結果를 볼 수 있었다. (Fig. 1).

그러나 auxin類中에서 NAA와 IAA는 2,4-D보다 callus組織의 生長이 不良함을 觀察할 수 있었다.

Kinetin $10^{-6}M$ 과 2,4-D $10^{-6}M$ 을 함유한 培地에서 callus組織의 生長率을 測定한 結果(Fig. 2), 培養後 2週間까지는 完만한 生長을 보이다가 培養 15~20日 사이에 가장 급속한 生長을 나타내었다. 培養 20日째에 callus組織의 生長量이 最大值에 달했으면 移植初에 비해 約 12倍의 增加率을 나타냈다.

繼代培養은 가장 투명하고 바깥면의 callus組織을 移植하여 生長率이 最大值에 달했을 時(20日)을 1세대로 하였다.

繼代培養 8代에서 바이러스가 除去되었고, 50代를 계속하였으나 世代와 같은 結果를 얻었다.

3. callus組織에서 바이러스 除去

callus組織內的 바이러스 消長을 調査하기 위하여 *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*의 완전히 전개된 上葉에 汁液接種을 하였더니 Table 4와 같은 結果를 얻었다.

Table 4. Decline of virus concentration in newly raised callus tissues by repeated transfers of translucent tissue

	Exp. No.	No of transfer ^{b)}				
		0	2	4	6	8
translucent tissue	1	25	18	10	7	0
	2	18	15	8	0	0
brown tissue	1	35				43
	2	28				40

a) Cultures were transferred every 20 days

b) Number of local lesions produced on 3 leaves



Fig. 3. The appearance of bud (arrow) newly formed after 30 days on the Murashige-Skoog basal medium containing kinetin $10^{-6}M$ and NAA $5 \times 10^{-6}M$.

Table 4에서 보는 바와 같이 투명하고 부드러운 callus組織을 8代 繼代培養을 하였을 때 바이러스 농도는 점차 低下해서 7~8代에 바이러스는 거의 除去되었음을 알 수 있다.

이와같은 現象은 植物體의 生長點先端에 가까워짐에 따라 組織內的 바이러스 농도가 急激히 低下되어 生長點先端에는 바이러스가 存在하지 않는다는 事實(森⁹⁾과 마찬가지로 투명하고 부드러운 부분의 callus組織을 繼代培養함으로써 바이러스 感染으로부터 벗어난 健全한 細胞가 급격히 增殖하기 때문에 바이러스가 除去된다고 추측된다.

4. callus組織으로부터 小植物體의 再分化

바이러스가 완전히 除去된 callus組織(8代 以後)으로부터 가장 투명한 부분을 적당량 취하여 Linsmaier and Skoog, White, Murashige and Skoog 등의 몇가지 基本培地와 cytokinin類(kinetin, Benzyladenine) 및 auxin類(2,4-D, NAA, IAA)를 組合하여 만든 培養基에 移植한 結果 Murashige and Skoog 基本培地에 kinetin $10^{-5}M$ 과 NAA $5 \times 10^{-6}M$ 를 함유한 것에서 再分化 現象을 관찰할 수 있었다(Fig. 3, 4).

摘 要

마늘의 바이러스 無感染性 生産과 種子 費用節減을 爲한 基礎的研究을 行하고져 마늘인편의 普通菜組織의 callus培養을 行하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 마늘 callus의 誘導 Linsmaier & Skoog는 基本培地에 Benzyladenine $10^{-5}M$ 과 2,4-D $10^{-6}M$ 에서 가장 良好한 結果를 얻었다.

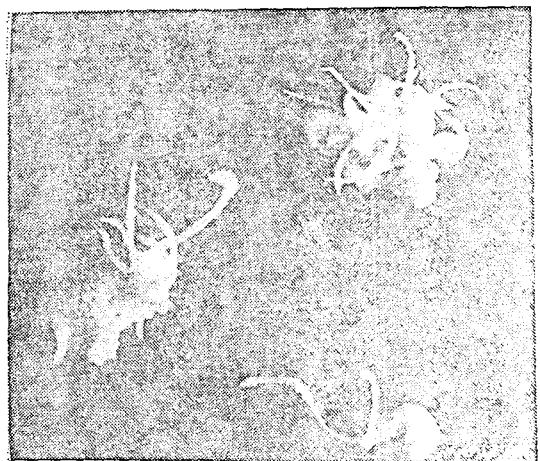


Fig. 4. The bud and plantlet, differentiated in the garlic callus culture, formed after 50 days.

2. callus生長은 Linsmaier & Skoog基本培地に kinetin 10^{-6} M과 2,4-D 10^{-6} M을 함유한 것이 가장良好하였다.

3. callus組織內的 바이러스消長을 觀察한 結果 분명하고 부드러운 callus組織을 8代 繼代培養을 하였을 때 바이러스는 除去되었다.

4. 바이러스無感染이 확인된 마늘 callus組織을 Murashige & Skoog基本培地に kinetin 10^{-6} M와 NAA 5×10^{-6} M을 함유한 배지에 移植하였을 때 再分化 되어 小植物體를 形成하였다.

引用 文 獻

1. Brierley, P., and F.F. Smith. 1944. Some virus diseases of alliums. *Phytopathology*. 34 : 990.
2. 鄭烈敦, 張茂雄, 1979. 韓國產 마늘의 virus感染에 관한 研究. 韓國園藝學會誌 20(2) : 123-133.
3. Graichen, K. 1975. *Arch. Phytopath. Pflsch* 11 : 399-403.
4. Havrānek, P. 1973. Occurrence of viruses in the genus *Allium* and virus-free clones of common garlic (*Allium sativum*). *Proc. 7th Conf. Czech. Pl. Virol. High Tatras 1971* : 133-136.
5. 羅瑢俊. 1973. 마늘 모자이크 바이러스에 관한 研究. 한국식물보호학회지. 12(3) : 93-107.
6. 李愚升. 1974. 韓國產地方 마늘의 休眠에 對한 生理 生態的研究, 學位論文(경북대학교)
7. Lee, Y.W., Yamazaki, S., Osaki, T., and Inouye, T. 1979. Two elongated viruses in garlic, garlic latent virus and garlic mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 45 : 727-734.
8. 李庚熙, 金炳友, 金鍾天, 金龍基. 1976. 組織培養에 의한 마늘의 virus 無毒株養成 및 增殖方法에 관한 研究. 건국대학교학술지 20 : 149-156.
9. 森寬一, 濱屋悅, 次下村, 徹池上雍春. 1969. 組織培養法によるウイルス罹病植物の無毒化. 日本農事試驗場報告 13 : 45-110.
10. 小川勉 1978. ニンニク種球生産とウクルスフリー株の育成, 芝菜種子生産研究會編野菜的採種技術 p . 92-99.
11. 大村敏博·脇本哲. 1979. 칼스培養法による無ウイルス植物の育成. 日本植物病理學會報44(3) : 387
12. 蘇仁永·金炯武. 1978. 組織培養에 의한 마늘바이러스 無病毒株에 관한 研究. I. 마늘 短縮莖의 組織培養, 全北大 農大論文集 9 : 12-19.
13. 蘇仁永·金炯武, 1979. 組織培養에 의한 마늘바이러스 無病毒株에 관한 研究 II. Callus 및 誘起植物體內的 바이러스 移行. 全北大 農大論文集 10 : 38-43.