

## 당근의 다량증식을 위한 순원기 배양

서호범 · 이수성\*  
중앙대학교 원예육종학과

### Shoot Primordium Culture for Multiplication of Carrot

SUR, Ho Bum · LEE, Soo-Seong\*

Department of Horticultural crops Breeding, Chung-Ang University, Ansung, 456-756, Korea

**ABSTRACT** Shoot tips with 2 leaf primordia were cultured to induce shoot primordia in MS liquid medium supplemented with several concentrations of BA and NAA under the conditions of 10,000 lux illuminations for 24 h and of vertical shaking of 2 rpm in carrot. Two F<sub>1</sub> hybrids and two male sterility lines were used. Shoot primordia were only induced in the medium supplemented with 2.0 mg/L of BA and 0.2 mg/L of NAA. Genotypic specificity and seasonal effect of donor parents on shoot primordia induction were not observed and average 15~ 20% of the planted domes developed to shoot primordia. The induced shoot primordia were successfully propagated by subculture in the same medium. However, they were grown into three different types during multiplication, that is, the type with multiple small shoots on the surface, the type of without any shoot, and the type of callus. Shoot primordia clusters with small shoots on the surface differentiated multiple shoots successfully in 1/2 MS solid medium supplemented with 0.2 to 1.0 mg/L of IAA and 0.2 to 1.0 mg/L of kinetin. New shoot primordia with small shoots were well formed when pieces bigger than 2 mm in diameter of the out layer of the shoot primordia cluster with small shoots were subcultured. No differences of multiplication and shooting ability and chromosomal variation of shoot primordia were observed until the 13th sub-culture.

**Key words:** Shoot tip culture, plant growth regulator, induced shoot primordium

#### 서 론

현재 보급되고 있는 당근의 주요 품종은 대부분이 1대잡종이다. 당근은 타가수정작물이기 때문에 다년간에 걸친 융성불임계통의 여교잡과 화분친의 자식과정을 거쳐 실용상 지장이 없을 정도의 순도를 갖는 1대잡종이 육성되고 있다. 그러나 이러한 양친 계통도 계속적인 형태교잡과 자식에 의한 증식 과정에 형질의 분리가 일어나서 몇 년이 지난 후에는 그 품종이 최초에 육성되었던 본래의 것과는 상당히 다른 형질을 나타내게 된다. 따라서 양친의 특성이 변하지 않고 유지, 증식

될 수 있는 영양번식적 다량증식 기술이 요구되어 왔다. 최근에 엽 원기가 2~3개 붙은 경정조직을 특수조건에서 배양하면 순 원기 (shoot primordia)가 유기되고 그것이 지속적으로 증식되며 염색체적으로 전혀 변이가 생기지 않는 순 원기 배양 기술이 1년생 식물인 *Haplopappus gracilis*를 재료로 한 연구에서 보고되었다 (Tanaka and Ikeda 1983). 이러한 조직배양의 순 원기란, "체세포를 강한 광선 밑에서 중력의 방향을 바꾸어 주면서 특정한 배지에 배양했을 때 생겨나는 dome 형태의 조직체로서 이들이 작은 덩어리를 형성해서 증식하는 배양체"라고 그들은 정의하고 있다 (Tanaka et al. 1985). 순 원기는 조직학적으로는 분열세포의 덩어리로 보이는 새로운 조직체인데 이들을 계대배양하여 계속 유지·증식시키다가 필요할 때 언제든지 기관분화 배지에서 묘화시킬 수 있다고 하였다 (Tanaka et al. 1988; Taniguchi et al. 1991). 이러한

\*Corresponding author. Tel 0334-670-3039  
E-mail sslee@naeri.cc2.cau.ac.kr

조직배양 순 원기 유기는 1986년부터 일본농림부의 국책사업으로 선정되어 각종 식물에 대하여 연구되었는데 (Oosawa and Yoshioka 1991) 1991년 현재 89종의 식물을 실험하였으며 그 중 66종에서 순 원기가 유기되었고 35 종류는 대량증식이 가능하다 (Taniguchi et al. 1991)고 하였다. 그뿐만 아니라 조직배양 순 원기를 통하여 2차 대사산물을 생산하려는 연구 (Himada et al. 1991; Hirata et al. 1993)가 진행중이며 callus에서도 순 원기 유기가 가능하다 (Taniguchi and Tanaka 1989)고 한다. 현재 우리 나라에서는 양파에서 순 원기 배양법이 성공하였다는 보고 (Jeong and Park 1997)를 제외하고는 아직 어떠한 작물에서도 순 원기 배양에 관한 보고가 없다. 이에 당근의 순 원기 배양법을 확립코자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

서울종묘사에서 분양받은 응성불임 계통인 brown anther type (BA-A) 1계통, petaloid type (PT-A) 1계통, 日本 다끼이사의 F<sub>1</sub> 품종인 이나리, 일반 시장에서 구입하여 품종명을 알 수 없는 품종 등 모두 4품종을 공시하였다.

순 원기의 유도를 위해 생장점이 있는 뿌리의 상부를 2.5 Cm 정도의 길이로 잘라 1%의 sodium hypochlorite 용액에 10분간 소독한 후 멸균수로 3~5회 수세하였다. 해부현미경을 사용하여 엽 원기를 2장 붙인 경정부위를 무균상에서 적출하고 곧바로 액체배지 10 mL를 넣은 시험관에 치상하였다. 그리고 직경이 60 Cm인 회전판에서 2 rpm으로 수직회전배양하였다. 광원을 형광등으로 하여 상부 10,000 lux, 하부 3,000 lux의 조도로 24시간 연속조명하였다. 배양온도는 25 ± 2°C였다. 배지는 Murashige and Skoog (1962) 기본배지에 NAA 0.0, 0.02, 0.2, 2.0 mg/L와 BA 0.2, 2.0 mg/L를 조합하여 첨가하고 pH를 5.8로 조절하여 시험하였다.

순원기의 계대배양시 그 증식능을 비교하기 위하여 식물 성장조절제의 종류와 농도를 순원기 유기조건과 동일하게 NAA 0.2 mg/L+ BA 2.0 mg/L로 고정하고 기본배지를 1/2MS와 MS 그리고 sucrose의 농도를 1%와 3%로 조정된 4종류의 액체배지를 만들어 시험하였다.

기관분화를 위한 배지는 기본배지를 MS 와 1/2 MS 둘로 하고 여기에 IAA 0.2, 1.0 mg/L와 kinetin(KN) 0.2, 1.0 mg/L을 조합하여 첨가한 모두 8종을 시험하였다.

순원기는 덩어리 표면에 신초를 형성하면서 자라는 것과 신초가 없는 두가지 형태로 구분되는데, 표면에 신초를 형성하면서 자라는 순원기 덩어리에서 기관분화가 잘 되었다. 그리하여 이러한 신초를 형성하면서 자라는 순원기를 유지·증식하기 위한 시험을 수행하였다. 배지는 MS + BA 2.0 mg/L+ NAA 0.2 mg/L로 고정하고 신초를 형성하면서 자라는 덩어리와 그렇지 않은 것의 비교를 하였고, 순원기 덩어리

의 내부조직과 외부조직을 비교하였으며 치상절편의 크기를 1~2 mm, 2~3 mm, 3~4 mm로 달리하여 시험하였다.

## 결과 및 고찰

당근의 순 원기 유기를 위한 적정배지를 구멍코자 시장에서 구입한 품종미상의 시료를 BA와 NAA를 혼용한 배지에 1992년 12월에 치상하였다 (Table 1). NAA를 첨가하지 않은 배지에서는 BA의 농도에 관계없이 모두 순이 발생하였고, NAA가 2.0 mg/L첨가된 배지에서는 BA의 농도에 관계없이 모두 캘러스만 발생하였다. BA 2.0 mg/L에 + NAA 0.2 mg/L가 첨가된 배지에서는 총 11개의 경정조직 중 3개는 캘러스, 5개는 무반응. 그리고 3개는 순 원기 덩어리를 형성하였다. 이러한 성장조절제의 조합에 따라 유기되는 조직이 다른 현상이나 동일한 조성의 배지에서도 무반응, 캘러스 또는 순 원기가 유기되는 현상은 기존의 많은 보고 (Tanaka and Ikeda 1983)들과 일치하고 있다.

캘러스는 한 개의 조직으로 된 세포의 덩어리이기 때문에 딱딱하고 배양용 칼로 잘랐을 때 잘 찢리지 않을 뿐 아니라 덩어리 표면이 다소 매끈하였다. 순 원기 덩어리는 작은 순 원기 돌기들이 모여서 하나의 커다란 순 원기 덩어리를 형성한 것이기 때문에 알사탕의 표면에 굵은 사탕입자가 붙은 것 같이 그 표면이 거칠어 보이며 회전배양기가 돌 때의 충격에 의해서 몇 개의 덩어리로 부서지기도 하고 계대배양시 편셋으로 잡기만 하여도 작은 덩어리들이 떨어져 나가는 등 캘러스와 구분하기가 어렵지 않았다 (Figure 1).

순 원기의 유기에 있어 품종간 및 모본의 성숙도에 따른

**Table 1.** Effects of combinations of BA and NAA in shoot tip culture of carrot for shoot primordia induction<sup>a</sup>.

NAA (mg/L)	BA (mg/L)			
	0.2		2.0	
0.0	S <sup>b</sup>	1/1 <sup>c</sup>	C+S	5/ 5
	C	6/8	S	1/ 9
0.02	N	2/8	C	6/ 9
			N	2/ 9
0.2	C	2/8	C	3/11
	N	6/8	N	5/11
			SP	3/11
2.0	C	4/4	C	5/ 5

<sup>a</sup> Cultural conditions:

- Basal medium: MS + sucrose 3%, pH 5.8
- Drum shaking: rotating drum ø 60 cm, 2 rpm
- Light: upper 10,000 lux, lower 3,000 lux with fluorescent lamp, 24 h.
- Temperature: 25°C

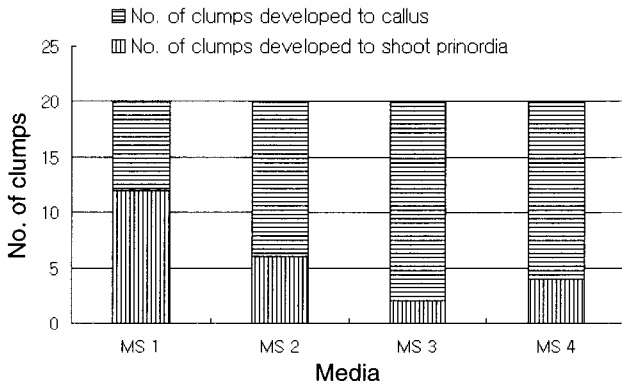
<sup>b</sup> C: callus, N: no response, S: shoot, SP: shoot primordia

<sup>c</sup> Number of shoot tips developed / number of shoot tips placed.

차이를 비교하고자 2개의 응성불임계통 (BA-A, PT-A)을 1994년 4월 19일에 파종하여 약 2개월 후에 치상하였으며 F<sub>1</sub> 품종인 '이나리'는 6월에 성숙하여 수확된 것을 다시 뿌리의 윗 부분 1/3만을 삼목한 후 7월에 치상하였다. 이때는 한가지 배지 (MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L)에만 치상하여 전술한 바와 동일한 조건에서 수직회전배양하였다. 그 결과 BA-A계통은 19개의 치상조직 중 캘러스 1개, 신초 발생 8

개, 무반응 7개와 함께 순 원기가 3개 발생하였다 (순 원기 발생률 15.8%). PT-A 계통에서는 총 14개의 치상조직 중 2개에서 순 원기를 획득할 수 있었다 (순 원기 발생률 14.3%). '이나리'의 경우 9개의 경정조직 중 2개에서 순 원기를 획득하였다 (순 원기 발생률 22.2%). 순 원기의 발생률은 각 품종 간에 큰 차이 없이 약 20%정도였다. 그리고 실험한 품종이 동일품종이 아니라서 품종의 차이라고도 생각할 수 있으나 겨울에 ('92년12월) 성숙한 뿌리의 아랫부분을 잘라내고 윗 부분 약 1/3만을 삼목하여 약 30~40일 후에 경정을 채취했던 품종미상의 시료와 (Table 1) 여름에 ('94년7월) 같은 방법으로 시료를 획득하여 치상하였던 '이나리' 및 실생의 두 응성 불임계를 비교하였을 때 순 원기 유기율에 큰 차이가 없는 것으로 미루어보아 순 원기의 유기는 재료의 인자형, 재배시기, 생리적 상태 등의 영향을 많이 받지 않는 것 같다 (Table 2).

유기된 순 원기의 증식률이 좋은 배지를 찾기 위하여 식물 성장조절제의 농도를 순원기가 유기된 조건과 동일하게 BA 2.0 mg/L에 NAA 0.2 mg/L로 고정하고 기본배지의 농도를 MS와 희석한 1/2MS 그리고 여기에 sucrose의 농도를 각각 1%와 3%로 하여 모두 4종의 액체배지를 시험하였다. 그 결과 순 원기가 유기된 배지 외의 다른 배지는 모두 캘러스 유기율이 너무 높아 증식용 배지로는 적합하지 않았다 (Table 3). 이러한 현상은 Tanaka 와 Ikeda (1983)가 *Hapropappus*



**Figure 1.** Effects of concentration of MS basal medium and sucrose on multiplication in subculture of induced shoot primordia in carrot.

- MS 1: MS + sucrose 3% + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L
- MS 2: 1/2 MS + sucrose 3% + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L
- MS 3: MS + sucrose 1% + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L
- MS 4: 1/2 MS + sucrose 3% + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L.

**Table 2.** Effects of cultivar, condition of donor plant, and cultural season on shoot primordia (SP) induction in shoot tip culture of carrot<sup>a</sup>.

Cultivar	Condition of donor plant	Cultural time	Number of shoot tips cultured	Number of shoot tips developed to			
				shoot primordia	callus	shoot+callus	no response
Unknown	adult	'92 Dec.	11	3	3	0	5
BA-A	Juvenile	'94 Jun.	19	3	1	8	7
PT-A	Juvenile	'94 Jun.	14	2	2	7	3
Inari	adult	'94 Jul.	9	2	0	3	4
	Total		53	10	6	18	19

<sup>a</sup> Culture medium: MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + sucrose 30 g/L.

**Table 3.** Effects of structure of shoot primordia, concentration of basal medium, and plant growth regulators on shooting from induced shoot primordia in carrot.

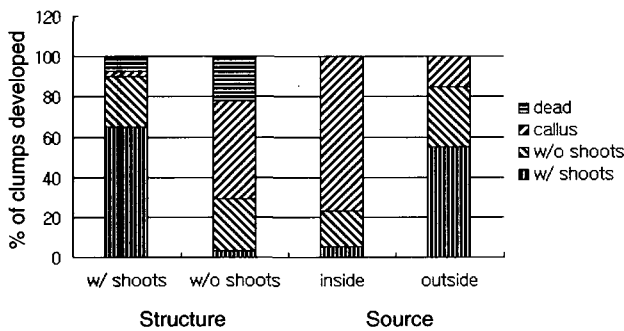
Basal media	IAA conc. (mg/L)	Kinetin (mg/L)				Total	
		0.2		1.0		A	B
		A <sup>a</sup>	B	A	B		
MS	0.2	6/ 7b	0/10	7/ 7	0/10	13/14	0/20
	1.0	3/ 7	0/10	3/ 7	0/10	6/14	0/20
	sub-total	9/14 (64)	0/20	10/14 (71)	0/20	19/28 (68)	0/40
1/2MS	0.2	7/ 7	0/10	7/ 7	0/10	14/14	0/20
	1.0	7/ 7	0/10	6/ 7	0/10	13/14	0/20
	sub-total	14/14 (100)	0/20	13/14 (93)	0/20	27/28 (96)	0/40
TOTAL		24/27 (89)	0/40	23/28 (82)	0/40	46/56 (82)	0/80

<sup>a</sup> Structure of mother shoot primordia: A: with little shoots, B: without shoot

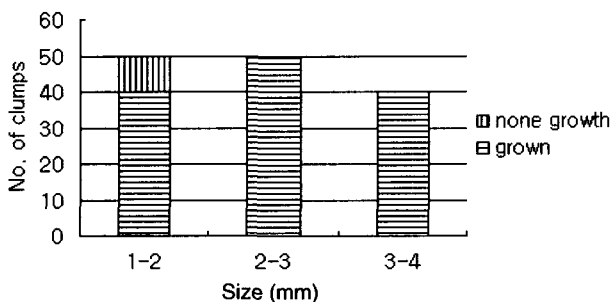
<sup>b</sup> Number of clumps shooted / Number of shoot primordia planted ( ): %

에서 이미 보고한 것과 비슷한 결과이다. 그리하여 이후의 계대배양에서는 순 원기 유기배지 한 종류만 사용하였다 (Figure 2).

순 원기를 계대배양하면서 한편으로는 MS기본배지에 IAA와 NAA 및 BA와 KN을 혼용한 여러가지 기관분화배지를 시험하였다, 그러나 식물생장조절제의 종류와 농도에 따른 순 발생율의 차이가 거의 없었으며 어떤 일정한 경향도 보이지 않았고 순이 가장 많이 발생한 배지에서도 신초 형성률이 치상 절편수의 20%를 넘지 못하는 저조한 성적을 보였다. 그런데 치상된 순 원기의 상태에 따라 차이가 생기는 것으로 보여 이에 관한 시험을 하였다. Taniguchi 등 (1991)에 의하면 순 원기는 계대배양 과정에서 3가지 형태로 발전한다고 하였다. 첫째, 유래되었던 형태 그대로의 모습으로 성장하는 것, 둘째, 순 원기 표면에 짧은 신초를 많이 형성하고 성장하는 것, 셋째, 켈러스로 변해 버리는 것 등이라고 하였는데 이러한 세 가지 형태의 순 원기를 본 실험에서도 figure 2에 나타낸 바와 같이 볼 수 있었다. 이처럼 순 원기는 신초를 형성하고 자라는 것과 신초 없이 자라는 것을 구분할 수 있었는데 이 둘 사이에 신초 발생능의 차이가 있는 것으로 느껴진 것이다. 그리하여 기관분화가 좀더 잘되는 배지를 찾고, 기관분화가



**Figure 2.** Effects of structure and source of subcultured clump of induced shoot primordia on development of daughter shoot primordia in carrot. Medium: MS+ BA 2.0 mg/L+ NAA 0.2 mg/L+ sucrose 3%.



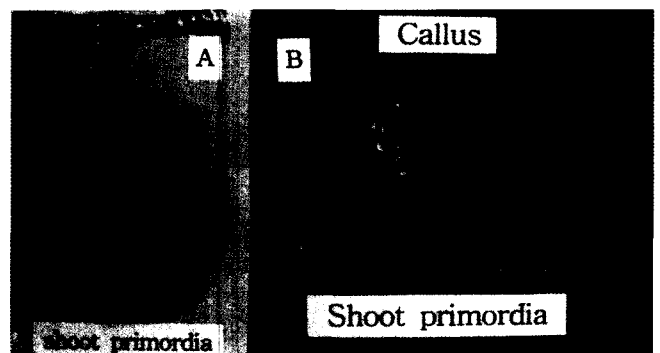
**Figure 3.** Effect of explant size on growth of induced shoot primordia carrot.  
<sup>a</sup>Every sub culture was accomplished when shoot primordia had grown to 20 × 20 × 20 mm.

잘 안되는 경우 신초 없이 자라는 순 원기에서 신초를 획득해 보고자 KN과 IAA의 농도를 세분하고 기본배지의 농도를 달리한 고체배지의 실험을 하였다. 그 결과는 table 3과 같다.

기관이 분화된 순 원기의 치상결과를 분석해 보면 기본배지는 1/2MS가 신초 형성률이 96.4%로 MS의 약 67.8%보다 높았다. IAA의 농도는 0.2 mg/L가 96.4%로 1.0 mg/L의 67.9%보다 높았으며, KN은 0.2 mg/L가 88.9%로 1.0 mg/L의 82.1%보다 약간 높았다. 즉 IAA와 KN은 0.2~1.0 mg/L 사이에 큰 차이가 없었는데 기본배지는 1/2MS가 좋은 것으로 판단할 수 있다. 그러나 신초를 형성하지 않고 자라는 순 원기 덩어리의 계대배양에서는 신초가 거의 발생하지 않아 기관분화가 용이한 신초를 형성하고 자라는 순 원기를 좀더 잘 유지 번식시키는 것이 중요하다고 판단되었다.

그래서 표면에 신초가 있는 것과 없는 순 원기 덩어리를 구분하여 계대배양 배지에 치상하고 신초를 형성하고 자라는 순 원기의 유기상황을 조사하였으나 신초가 없었던 것에서는 65개의 치상조직 중 2개만이 신초가 있는 순 원기로 자랐다. 신초를 형성하면서 자라는 순 원기 덩어리를 다시 내부와 외부로 구분하여 치상하였다. 그 결과 내부조직절편의 시험관은 40개 중 2개만이 신초를 가진 순 원기 덩어리로 증식하는데 반해 외부조직은 40개의 치상조직 중 21개의 조직이 다시 신초를 가진 순 원기로 재분화하였다 (Figure 4). 이것은 “순 원기 덩어리 조직의 구조는 2층 구조로 되어 있으며 표면부위에 단세포 층의 분열조직이 분포한다”는 보고로 미루어 볼 때 표면의 조직은 세포분열이 왕성한 조직을 포함하고 있는데 반해 내부조직은 이미 분열조직으로서의 기능을 잃어버렸기 때문이 아닌가 사료된다.

계대배양 조직을 크기별로 구분하여 치상하여 보았다 그 결과 절편의 크기가 1~2 mm인 경우 치상조직 중 10%가 갈변되어 고사되었으며 2 mm 이상인 경우는 모두 순원기 덩어리로 잘 유지되었다. 그런데 순 원기의 성장속도 즉, 계대배양 후 다음 번 계대배양을 할 때 (배양용 시험관에 딱 찰 정도의 만 크기, 약 20×20×20 mm)까지로 자라는 데 걸리는 기간은 치상절편체가 클수록 더 잘 자랐다. 즉, 크기가 2~3 mm



**Figure 4.** Shoot primordia induced from shoot tip (A) and shoot primordia with shoots (right of B) and without shoots (left of B) and callus (top of B) developed from shoot primordia in subculture.

인 것은 약 30일, 3~4 mm인 것은 약 20일 정도 자라면 20×20×20 mm의 크기로 자랐다 (Figure 5).

지금까지의 실험결과 하나의 순원기절편을 액체 배지에 치상하였을 때 한달 후 약 15개의 신초를 형성하는 순원기 절편을 획득할 수 있었다. 계산하여 보면  $15^n$  (n = 월 수)로 약  $8.7 \times 10^{12}/\text{年}$  개의 신초를 형성하면서 자라는 순 원기를 생산할 수 있다. 그리고 13번의 계대배양 세대가 경과될 때까지 계대배양 후의 증식 능력에 있어서 어떤 변화도 감지할 수 없었으며, 염색체상의 변이도 발견되지 않았다.

## 적 요

당근의 기내 증식에 있어서 계대배양을 반복하더라도 분열능과 재분화능에 차이가 없고 변이가 생기지 않는 순 원기 배양법을 확립코자 하였다. 엽 원기 2개가 붙은 경정조직을 BA 2.0 mg/L와 NAA 0.2 mg/L를 첨가한 MS 기본 액체배지에 치상하고 24시간 강한 광선 아래 2 rpm으로 수직 회전배양하였을 때 순 원기가 유기되고 덩어리로 자라났다. 순 원기 유기는 공여친의 유전자형과 재배 계절 및 발육단계의 영향을 거의 받지 않는 것으로 판단되었다. 이 순 원기 덩어리는 사방 2~3 mm 정도의 크기로 순 원기가 유기된 배지에 계대배양하였을 때 잘 증식되었는데 표면에 작은 신초를 가진 것과 그렇지 않은 것, 그리고 캘러스의 3가지 형태로 분화하였다. 표면에 작은 신초를 가진 것이 역시 표면에 작은 신초를 가진 순 원기 덩어리로 증식되었다. 이 표면에 작은 신초를 가진 것이 1/2MS 기본배지에 KN 0.2~1.0 mg/L과 IAA 0.2~1.0 mg/L를 첨가한 고체배지에서 주로 식물체로 잘 분화하였다. 일단 순 원기가 유기되어 덩어리를 형성한 후에는 1년 동안에  $8.7 \times 10^{12}$  개의 비율로 증식될 수 있을 것으로 계

산되었다. 그리고 13번의 계대배양 후에도 증식능에 차이가 없었으며 염색체상의 이상도 없었다.

## 인용문헌

- Himada H, Hoshno T, Ohsato K (1991) The production of capillen in shoot primordia of *Artemisa capillaris*. Plant Tiss Cult Lett **8**:190-192
- Hirata T, Izumi S, Akita K, Fukuda N (1993) Formation of oil bodies in cultured shoot primordia of *Matricaria chamomilla*. Plant Tiss Cult Lett **10**:289-292
- Jeong HB, Park HG (1997) Plant redifferentiation and *in vitro* multiplication of onion by shoot primordium culture. J Kor Soc Hort Sci **38**:123-128
- Oosawa S, Yoshioka G (1991) Mass propagation by shoot primordium- status of vegetable and flowers. Bio Hort **6**:14-20
- Tanaka R, Ikeda H (1983) Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* (2n=4) by shoot tip cloning. Jap J Genet **58**:65-70
- Tanaka R, Taniguchi K, Kamisugi Y (1985) Induction of single cell stage in tissue cultured shoot primordia of *Hapropappus gracilis* (2n= 4), a preliminary report. Jap J Genet **60**:405-410
- Tanaka R, Taniguchi K, Miyagawa H, Fujishige I, Ikeda H (1988) Stock of chromosome-type and tissue cultured shoot primordium. Yakugaku Zasshi **108**:1023-1039
- Taniguchi K, Tanaka R (1989) Induction of shoot primordia from calli of *Crepis capillaris* (2n= 6) and regeneration of plantlets. Jap J Genet **64**:199-208
- Taniguchi K, Tanaka R, Kondo K (1991) Recent trends of shoot primordium researches. Bio Review, Bio Industry **8**:5-13

(접수일자 1998년 11월 5일)