

# 산마늘 다신초 덩어리로부터 인경 형성과 비대에 미치는 *methyl jasmonate* 의 영향

박소영\*, 안진권, 이위영, 박혜진  
국립산림과학원 생물공학과

## Effect of Methyl Jasmonate on *in vitro* Bulblet Formation and Enlargement from Shoot Clump of *Allium victorialis*

So-Young Park\*, Jin-Kwon Ahn, Wi-Young Lee, Hae-Chin Park  
Biotechnology Division, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

**ABSTRACT** The effect of abscisic acid (ABA) and methyl jasmonate (MeJA) on bulblet formation from the culture of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* Makino was studied. Shoot clumps were cultured on MS medium containing ABA (0, 0.01~2.0 mg/L) and MeJA (0.01~5.0 mg/L). ABA at low concentrations (0.01 mg/L) induced shoot proliferation without bulblet formation. However, bulblet formation started on the medium containing MeJA approximately in 4-6 weeks of culture. Furthermore, 1.0 mg/L MeJA resulted in bulblet formation at high frequency (100%) as compare to the control (46.1%). Cortical cells of the bulblets enlarged on medium with MeJA had dense protein-like substance in expanded and round cells when examined under the microscope. The data described here show that formation and enlargement of bulblets from *Allium victorialis* can be improved by addition of appropriate concentration of MeJA.

**Key words:** abscisic acid, cell expansion, light microscope, methyl jasmonate

### 서 론

산마늘은 국내에 자생하는 *Allium*속의 다년생 식물로 자연 상태에서 영양 번식율이 매우 낮다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 조직배양에 의한 영양계증식이 모색되어 왔다 (Kim et al. 1996). 구근류의 미세번식은 순화율을 향상시키고 저장 용이하게 하기위해 기내배양의 마지막 단계에 인경이나 구를 형성시키는 것이 일반적이다 (Debeljak et al. 2002). 기내 배양 과정 중 구근류의 인경형성에 미치는 요인에 관하여는 sucrose (Debeljak et al. 2002; Han et al. 1999; Kastner et al. 2001; Zel et al. 1997), 생장조절물질 (Koda and Kikuta 1991;

Van den Berg and Ewing 1991) 및 배양환경 (Niimi et al. 1999; Yamagishi 1998) 등의 요인이 보고되었는데, 그 중 ubiquitous cyclopentanone 화합물인 jasmonates는 감자 (Koda 1997), 난 (Debeljak et al. 2002), yam (Koda and Kikuta 1991), *Narcissus triandrus* (Santos and Salema 2000), 양파 (Nojiri et al. 1992), 마늘 (Ravnikar et al. 1993; Zel et al. 1997) 등에서 구 형성과 비대 효과가 보고되었고, 특히 jasmonic acid (JA)의 methyl ester인 methyl jasmonate (MeJA)는 구 형성에 강한 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Koda 1997).

MeJA는 스트레스 환경하에서 abscisic acid (ABA)와 비슷한 작용을 하는데 식물세포로부터 다량의 polypeptides와 저장단백질을 생합성하고 (Parthier 1991) 자연계에서 식물생장과 발아 억제, 구 형성, 노화 촉진 등에 영향을 미친다 (Creelman and Mullet 1997). 최근에는 이와 관련하여 ABA와

\*Corresponding author Tel 031-290-1167 Fax 031-290-1020  
E-mail: soypark7@foa.go.kr

jasmonates와의 관계에 대한 연구가 보고되고 있다 (Reinbothe et al. 1992; Hays et al. 1999).

본 연구는 산마늘의 다신초 덩어리로부터 인경형성에 미치는 MeJA와 ABA의 영향과 조직학적 관찰을 통해 인경형성과 비대의 원인을 구명하여 유용 산림자원인 산마늘의 기초 연구자료로 활용하고자 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

기내에서 배양중인 산마늘의 단축경 부위를 0.5×0.5 cm 크기로 절단하여 BA 3.0 mg/L과 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에서 다신초를 유도하고 동일한 배지에서 3차례 이상 증식한 다신초 덩어리 (shoot clump)를 본 실험의 재료로 이용하였다. 다신초 덩어리를 4~6개의 신초가 포함되게 0.1 g 크기로 절단하여 여과살균된 ABA 0, 0.01~2.0 mg/L, methyl jasmonate (MeJA) 0.01~10.0 mg/L가 각각 첨가된 MS 배지에 8주간 배양하여 인경형성을 조사하였다. 모든 배지에는 6% sucrose와 0.75%의 agar (Sigma사)를 동일하게 첨가하였으며 멸균전 pH를 5.7~5.8로 조정한 후 121°C, 1.2기압 하에서 고압증기멸균하였다. 배양은 100 mL의 배지가 분주된 400 mL 플라스틱 원형용기 (동양물산)에 5개의 절편체를 배양하여 처리당 5반복하였고, 모든 배양은 형광등 하에서 25~30  $\mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광량자속밀도와 23±1°C 온도가 유지되는 배양실에서 16시간 일장으로 8주간 진행하였다.

배양 8주 후 인경형성, 인경무게, 건물중 등을 조사하였다. 이때 인경은 신초가 인편에 싸여있으면서 직경이 3 mm 이상인 것으로 하였고, 절편체인 다신초 덩어리의 신초 중 50% 이상에서 인경이 형성되었을 때 인경형성으로 포함시켰으며 인경무게와 건물중은 다신초 덩어리에서 잎과 뿌리를 제거하고 인경무게를 측정한 다음, 상온에서 1주간 음건하여 절편체에서 형성된 총 인경의 건물중으로 하였다.

### 조직화학적 관찰

실험 종료 후 처리별로 형성된 인경을 채취하여 1.5% glutaraldehyde와 1.6% paraformaldehyde가 첨가된 고정액에 48시간 동안 고정하였다. 시료를 에탄올로 탈수한 다음 Technovit 7100 (Kulzer, Germany)으로 포매하고 (Yeung 1999) microtome (Leica 2040)으로 3  $\mu\text{m}$  두께로 절단하였다. PAS (periodic acid-Schiff's reaction) 용액으로 총 탄수화물을 염색하고 naphtol blue black (Sigma사)으로 단백질을 염색하여 광학현미경 (Leica DC300F, Germany)하에서 50~200배 수준으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

산마늘의 다신초 덩어리 절편을 ABA와 MeJA가 농도별로 첨가된 MS 배지에서 8주간 배양한 다음 인경형성을 조사하였다 (Figure 1). ABA 1.0~2.0 mg/L을 첨가한 처리구에서는 약 80%의 절편체에서 인경이 형성 되었으며 (Figure 3), 저농도 (0.01 mg/L)의 ABA 처리구에서는 인경형성보다 오히려 신초가 증식되었다 (Figure 2). 마늘에서는 저농도의 JA 첨가에 의해 신초가 증식되고 고농도에서 인경이 형성되는 것이 보고된 바 있는데 (Ravnikar et al. 1993) 본 실험의 산마늘에서는 ABA 처리에서 유사한 결과를 얻었으나 저농도 MeJA에 의한 신초증식은 관찰되지 않았다. 0.5 mg/L 이상의 MeJA 처리구에서 배양 4~6주 정도에 신초 기부에서 인경이 형성되었는데 고농도로 첨가됨에 따라 형성된 인경표피가 자색을 띠면서 비대가 이루어졌다. 1.0 mg/L MeJA 처리구에서 100%의 절편체에서 인경이 형성되어 무처리구 (46.1%)와 ABA 첨가구에 비해 높은 인경형성율을 보였고 (Figure 3), 건물물에 ABA 처리농도가 증가할수록 형성된 인경의 건물물은 감소하였으나, MeJA 처리구에서는 농도에 따라 형성된 인경의 건물물에 크게 변화가 없었다 (Figure 4).

인경이나 구근의 형성과 비대를 위해 종종 고농도의 sucrose 처리가 고려되는데 (Han et al. 1999; Haruki et al. 1996; Kastner et al. 2001) 고농도의 sucrose는 기내 식물의 당 급원으로서의 역할뿐 아니라 배지의 삼투압을 조절함으로써 구근 식물의 구 비대를 유도한다 (Kovac and Ravnikar 1998). 그러나 고농도의 sucrose에 의해 비대된 구는 휴면에 들어가게 되

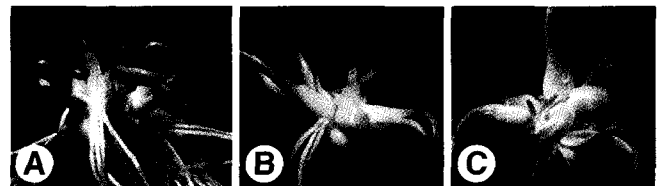


Figure 1. Bulblets enlarged from shoot clump on MS medium after 8 weeks in culture. A, A clump of bulblets formed on MS medium showing the vigorous rooting; B, Small bulblets formed on MS medium containing ABA 1.0 mg/L; C, Well developed bulblets on MS medium containing MeJA 1.0 mg/L.

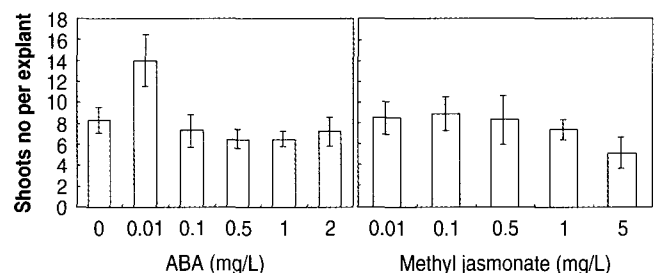


Figure 2. The effect of ABA and MeJA on shoot formation from explant (shoot clump segment) of *Allium victorialis* after 8 weeks in culture. vertical bars:  $\pm$ SE.

고 순화 직전 구의 휴면타과는 필수적이다. *Allium wakegi*의 비대된 인경에서 내생 ABA의 함량이 비대되지 않은 인경보다 월등히 높게 나왔고 이 ABA의 함량은 휴면의 깊이가 깊을수록 높았는데 (Yamazaki et al. 1999) 이는 높은 삼투압이나 외생 ABA과 같은 요인에 의해 내생 ABA의 함량이 높아지고 그로인해 휴면에 접어들면서 영양물질을 저장하기위해 자연적으로 인경 형성과 비대가 이루어짐을 시사한다. 그러나 산마늘 인경비대를 위해 고농도의 sucrose에 배양한 경우 농도에 따라 비대정도에 차이는 있었으나 형성된 인경의 크기가 균일하지 않았고 인경형성보다는 식물체 기부가 비대되는 정도였다 (결과 미제시). 외생 MeJA 처리에 의해 식물체내에서 ABA의 생합성이 증가하는데 (Hays et al. 1999), 산마늘 인경 비대시 처리에 의해 증가된 내생 ABA에 의해 인경비대가 이루어 졌다고 보기 어려운 점은 본 실험에서 외생 ABA 처리구 역시 형성된 인경의 크기가 균일하지 않았고 인경형성율도 MeJA 처리구보다 낮았다는데 있다. 그렇다면 이는 인경의 비대의 주요인이 ABA나 MeJA 처리에 의해 증가된 내생 ABA라기보다 다른 원인이 있음을 시사한다고 하겠다.

Mita와 Shibaoka (1983)는 양파에서 인경이 비대될 때 호르몬에 의해 세포골격 형성에 관여하는 미세소관이 파괴되어 세포가 등글어지고 결국 구가 비대된다고 하였다. 이와 유사한 결과로 Koda (1997)는 감자의 구 형성과정에서 jasmonate가 당 집적을 유도하여 세포의 삼투압을 높이고, 미세소관의 기능을 방해하며 cellulose 생합성으로 세포벽의 구조를 팽창에 적합하게 변하게 함으로써 세포의 팽창을 유도한다고 하여 MeJA 처리에 의해 인편의 세포가 팽창되어 인경이 비대될

수 있음을 보여 주었다.

인경 외피세포와 세포내 집적된 물질을 관찰하기위해 처리별로 형성된 인경을 PAS와 naphtol blue black으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다 (Figure 5). 성장조절제 무첨가구에서 인편 외피의 세포는 대부분 비교적 작고 길며 액포화되어 있었으나 (Figure 5A, C), MeJA 1.0 mg/L 첨가구에서 형성된 인경은 세포가 크고 등근 형태로 팽창되어 있었으며 단백질로 차 있음이 관찰되었다 (Figure 5B, D). MeJA는 식물체내에서 당 집적을 유도하므로 (Kovac and Ravnikar 1998) 형성된 산마늘의 인경내에 다량의 전분 집적이 있으리라 예측하였으나 등글게 팽창된 세포내에 전분립은 보이지 않았고 세포내 가득 찬 단백질만이 관찰되었다. 이 단백질은 MeJA 처리로 인해 형성된 저장단백질로 추측되는데 이와 관련하여 Santos and Salema (2000)는 MeJA 처리에 의해 저장 단백질 napin과 oil-body 단백질 oleosin의 생합성이 증가한다고 하였다.

이상의 결과로 산마늘의 인경형성과 비대에는 MeJA 처리가 효과적이며 이는 MeJA 처리에 의해 형성된 내생 ABA의 영향보다는 MeJA에 의해 인편 외피세포가 팽창되어 인경이 비대 되었음을 추정할 수 있었다.

적 요

산마늘의 다신초 덩어리로부터 인경형성을 위해 ABA와 MeJA가 첨가된 MS 배지에서 배양하였다. 저농도 (0.01 mg/L)

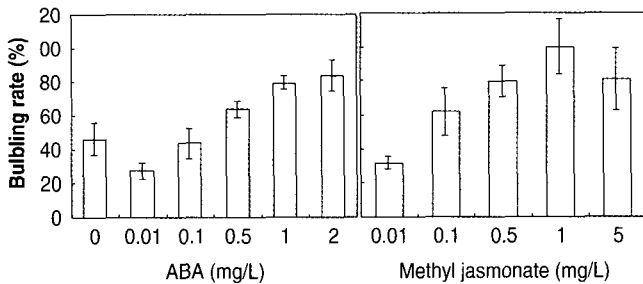


Figure 3. The effect of ABA and MeJA on bulblet formation from explant (shoot clump segment) of *Allium victorialis* after 8 weeks in culture. vertical bars: ±SE.

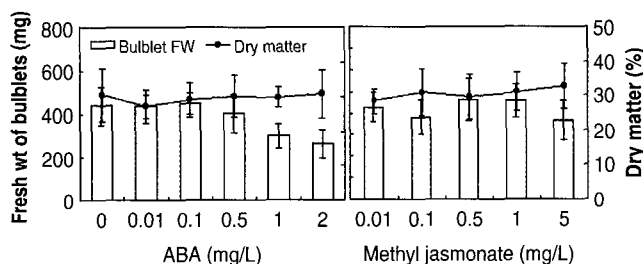


Figure 4. Fresh weight and dry matter of bulblets formed and enlarged on MS medium containing ABA and MeJA.

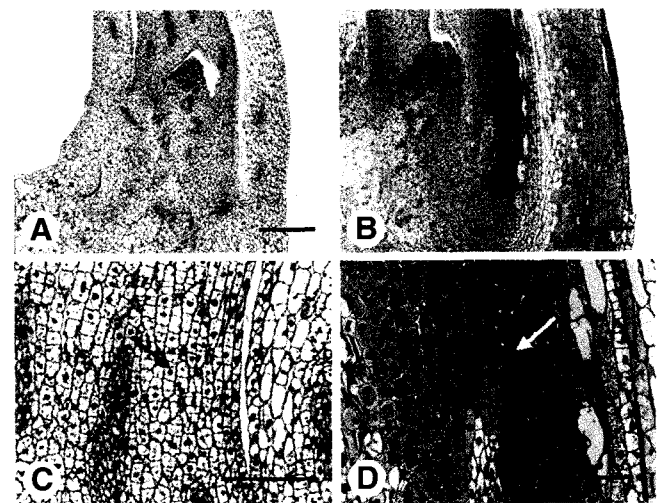


Figure 5. Longitudinal section of a bulblet formed on MS medium without growth regulator (A, C) and with MeJA 1.0 mg/L (B, D). A, Bulblets grown on MS (bars=500 μm); B, Bulblets grown on 1.0 mg/L MeJA medium (bars=500 μm); C, Small and vacuolated cells (black arrow) of bulblet without growth regulator; D, Round and expanded cells (white arrow) of bulblet with 1.0 mg/L MeJA (bars=200 μm).

의 ABA 처리구는 인경 형성보다 오히려 신초의 증식을 유도하였다. 인경은 MeJA 처리구에서 배양 4~6주 후 형성되기 시작하여 1.0 mg/L MeJA 처리구에서 다신초 덩어리로부터 100% 인경형성이 이루어졌다. 조직학적 관찰 결과 생장조절제가 첨가되지 않은 배지의 인경과는 달리 MeJA 처리구에서 비대된 인경의 외피세포는 크고 둥글며 단백질 등의 물질로 가득 차 있었다. 산마늘의 다신초 덩어리로부터 인경형성에 MeJA가 촉진적임을 알 수 있었다.

## 인용문헌

- Creelman RA, Mullet JE (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 355-381
- Debeljak N, Regvar M, Dixon KW, Sivasithamparam K (2002) Induction of tuberisation *in vitro* with jasmonic acid and sucrose in an Australian terrestrial orchid, *Pterostylis sanguinea*. *Plant Growth Reg* 36: 253-260
- Han BH, Yae BW, Goo DH, Ko JY (1999) Effects of inorganic salts in MS medium, sucrose, and activated charcoal on bulblet formation from *in vitro* bulb scales in *Lilium* Oriental hybrid 'Casa Blanca'. *J Kor Soc Hort Sci* 26: 103-107
- Haruki K, Yamada K, Hosoki T, Ohta K (1996) Effect of sugar and temperature on the growth of miniature bulblets of *Lilium japonicum* Thunb cultured on a rotary shaker. *J Jap Soc Hort Sci* 65: 363-371
- Hays DB, Wilen RW, Sheng C, Molony MM, Pharis RP (1999) Embryo-specific gene expression in microspore-derived embryos of *Brassica napus*. An interaction between abscisic acid and jasmonic acid. *Plant Physiol* 119: 1065-1072
- Kastner U, Klahr A, Keller ERJ, Kahane R (2001) Formation of onion bulblets *in vitro* and viability during medium-term storage. *Plant Cell Rep* 20: 137-142
- Kim WB, Kim JG, Lee EA, Kim BH, Kim JK, Lim HT (1996) Plant regeneration from bulb explants of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* Makino. *Korean J Plant Tiss Cult* 23: 123-127
- Koda Y, Kikuta Y (1991) Possible involvement of jasmonic acid in tuberization in Yam plants. *Plant Cell Physiol* 32: 629-633
- Koda Y (1997) Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiol Planta* 100: 639-946
- Kovac M, Ravnikar (1998) Sucrose and jasmonic acid interact in photosynthetic pigment metabolism and development of potato (*solanum tuberosum* L. cv. Sante) grown *in vitro*. *Plant Growth Reg* 24: 101-107
- Mita T, Shibaoka H (1983) Changes in microtubules in onion leaf sheath cells during bulb development. *Plant Cell Physiol* 24: 109-117
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta* 15: 473-497
- Niimi Y, Nakano M, Isogai N (1999) Effects of temperature and illuminating conditions on regeneration and development of bulblets in scale culture of seven *Lilium* spp. *J Jap Soc Hort Sci* 68: 28-34
- Nojiri H, Yamane H, Seto H, Yamaguchi I, Murofushi N, yoshihara T, Shibaoka H (1992) Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonic acid in bulbing and non-bulbing onion plants. *Plant Cell Physiol* 33: 1225-1231
- Parthier B (1991) Jasmonates, new regulators of plant-growth and development - many facts and few hypothesis on their actions. *Bot Acta* 104: 446-456
- Ravnikar M, Zel J, Plaper I, Spacapan A (1993) Jasmonic acid stimulates shoot and bulb formation of garlic *in vitro*. *Plant Growth Reg* 12: 73-77
- Reinbothe S, Reinbothe C, Lehmann J, Parthier B (1992) Differential accumulation of methyl jasmonate-induced mRNAs in response to abscisic acid and desiccation in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol Plant* 86: 49-56
- Santos I, Salema R (2000) Promotion by jasmonic acid of bulb formation in shoot cultures of *Narcissus triandrus* L. *Plant Growth Reg* 30: 133-138
- Van den Berg JH, Ewing EE (1991) Jasmonates and their role in plant growth and development, with special references to the control of potato tuberization: a review. *Am Potato J* 68: 781-794
- Yamagishi M (1998) Effects of culture temperature on the enlargement, sugar uptake, starch accumulation, and respiration of *in vitro* bulblets of *Lilium japonicum* Thumb. *Sci Hort* 73: 239-247
- Yamazaki H, Nishijima T, Yamato Y, Koshioka M, Miura H (1999) Involvement of abscisic acid (ABA) in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki I. Endogenous levels of ABA in relation to bulb dormancy and effects of exogenous ABA and fluridone. *Plant Growth Reg* 29: 189-194
- Yeung EC (1999) The use of histology in the study of plant tissue culture systems-some practical comments. *In Vitro Cell Dev Biol* 35: 137-143
- Zel J, Debeljak N, Uzman R, Ravnikar M (1997) The effect of jasmonic acid, sucrose and darkness on garlic (*Allium sativum* L. cv. ptujski jesenski) bulb formation *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol* 33: 231-235