

## 생물반응기에서 배양된 마늘 신초와 Microbulb의 형태발달 및 조직관찰

김은경, 한은주, 백기엽\*  
충북대학교 첨단원예기술개발연구센터

### Morphological Development and Histology of Multiple Shoots and Microbulbs of Garlic Cultured in Bioreactors

Eun-Kyung Kim, Eun-Joo Hahn, Kee-Yoeup Paek\*

Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University,  
Cheongju 361-763, Korea

**ABSTRACT** Multiple shoots of garlic (*Allium sativum* L.) were propagated in bioreactors containing MS medium supplemented with 2% sucrose for 3 weeks. Microbulbs were induced on MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 11% sucrose for 9 weeks. For multiple shoot proliferation, leaves in the shoot must be removed before cultures. When the multiple shoots were cultured without removal of leaves, more than 90% of hyperhydricity and no microbulb formation were observed. Histological observation also indicated irregular size and shape of the cells in hyperhydricity of the shoot. Microbulbs were started to form from the shoot after 7 weeks of culture by protuberance of adventitious shoot buds followed by inner periclinal divisions and simultaneous anticlinal division in the epidermis of meristematic bulge. Analysis of ploidy level indicated no phenotypic variations in both multiple shoots and microbulbs induced from the mother plant, suggesting genetic homogeneity among the regenerants.

**Key words:** *Allium sativum* L., ploidy level

#### 서 론

바이러스 감염으로 인한 마늘의 수량과 품질의 저하를 방지하기 위해서 퀼러스배양 (Novak 1980), 정단배양 (Bhojwani et al. 1983), 뿌리배양 (Such and Park 1995) 등을 통한 무병 종구의 생산이 이루어지고 있다. 이 중 성장점 부위로부터 신초를 유도하고 이들 신초를 다신초로 증식시킨 후 microbulb를 형성시키는 방법이 가장 널리 이용되고 있다 (Bhojwani et al. 1983; Matsubara and Chen 1989; Moriconi et al. 1990). 그러나 신초로부터의 microbulb 형성 효율이 높지 못해 이에 대한 많은 연구가 필요하다. Kim 등 (2003)은 마늘의 신초 증식과 microbulb 형성 효

율을 높이기 위해 액체배양을 실시하였고 그 외 PPF, 온도, 당농도, 생장억제제, elicitor 처리 등의 실험을 통해 최적 배양 환경을 확립하였다. 이후 이들 결과를 생물반응기 배양에 적용시켜 마늘 신초의 증식과 microbulb의 형성 효율을 크게 높일 수 있었다 (Kim et al. 2004). 생물반응기 배양의 경우, 액체 배지를 사용하고 용기 내 물리, 화학적 환경을 배양 식물체나 배양체의 종류 (callus, root, shoot, microbulb 등)에 따라 자유롭게 조절할 수 있다는 장점에 마늘 이외에도 백합 (Lian et al. 2002), 호접란 (Park et al. 2002), *Anoectochilus formosanus* (Ket et al. 2004) 등 다양한 원예식물의 효율적인 기내배양 방법으로 인식되고 있다.

한편, 신초의 증식을 통한 배양 방법은 안정적이며 기내에서 변이 발생이 거의 없지만 배양기간이 늘어나거나 옥신의 사용, 특히 2,4-D와 같은 호르몬을 장기적으로 공급한 경우에는 기형적이고 불완전한 구의 형성 및 재생된 식

\*Corresponding author Tel 043-266-3245 Fax 043-272-5369  
E-mail paekky@chungbuk.ac.kr

물체의 배수체 변이 등이 일어날 수도 있다 (Lee and Lee 1994; Palomino et al. 1999). 식물 조직의 배수성 분포는 체세포 조직이나 종에 따라 다양한데, 'Polysomaty'는 다른 배수성 수준을 가지고 있는 세포로 구성된 조직이나 기관으로 분화 과정에서 많이 일어나는데, 피자식물의 다양한 조직과 기관에서 발견되었으며, 특히 기내 배양을 통해 재분화된 조직이나 기관에서 많이 발견된다는 보고가 있었다 (Mishiba and Mii 2000).

본 실험은 마늘의 생물반응기 배양에서 배양체 상태에 따른 신초의 증식과 과수화 정도를 알고, 신초로부터 microbulb의 형성 과정을 형태, 조직적으로 관찰하였다. 또한 초기에 모주로 사용한 마늘 종구, 이로부터 유도된 신초와 microbulb의 배수성 test를 통해 배수체의 변이 여부도 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 마늘의 신초 상태에 따른 생물반응기 배양

기내 증식된 마늘의 신초 덩어리(0.15-0.2 g)를 5 L 생물반응기 내 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본 배지와 sucrose 2%가 첨가된 배지에서 3주간 배양하였다 (Kim et al. 2004). 배양체의 상태에 따른 신초의 증식과 microbulb의 형성의 차이를 알기 위해 신초의 잎을 제거한 후 치상하거나 잎을 제거하지 않고 치상하였다. 배양은 풍전형 공기 부양식 생물반응기를 이용하였고 용기 내 공기 공급은 0.1 vvm으로 조절하였다. 배지는 ebb & flood 방식으로 1일 2회 6시간 동안 공급하였으며 25±1℃에서 50 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>의 광도로 16시간 동안 형광등을 이용하여 배양하였다. 배양 3주 후 생체중, 정상적인 신초의 수, 과수화 정도를 조사하였고 정상적 신초와 과수화된 신초의 조직을 관찰하기 위해 FAA (formalin:acetic acid:alcohol = 1:1:1)에 고정시킨 다음, 알코올과 크실렌으로 탈수시켜 embedding한 후 microtome을 이용하여 10-12 μm 간격으로 잘라, safranin과 fast-green으로 이중염색 한 후 mounting하여 실체 현미경으로 관찰하였다.

### 마늘 microbulb의 형태 발달 및 조직 관찰

생물반응기에서 증식된 마늘 신초로부터 microbulb의 생

산을 위해 증식에 사용되었던 배지를 NAA 0.1 mg/L와 sucrose 11%를 첨가한 MS배지로 교환하여 9주간 배양한 후 (Kim et al. 2004), 생물반응기에서 배양된 신초로부터의 microbulb의 형성 과정을 관찰하였다. Microbulb의 형태 발달은 배양 단계를 고려하여 해부현미경 하에서 관찰하였으며, 조직 관찰을 위해 배양 1주 간격으로 신초의 기부와 잎을 채취하여 앞서와 같은 방법으로 해부 현미경으로 관찰하였다.

### 배수성 검정

재래종 마늘 (단양 산)과 이로부터 유도 후 증식된 신초 (40회 계대배양), 신초로부터 생산된 microbulb를 대상으로 보리를 internal standard로 하여 배수성 검정을 실시하였다. 모주와 신초는 각각 30개체, microbulb는 10개의 생물반응기에서 10개체씩 100개체의 보통엽을 0.5×0.5 cm로 자른 후 chopping하여 핵을 추출한 다음 30 μm의 CellTrics (PA, Partec GmbH, Germany)로 여과한 다음 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 용액으로 염색하여 Ploidy analyser (PA, Partec GmbH, Germany)를 사용하여 배수성을 판정하였다.

마늘의 DNA 함량 분석은 internal reference standard로 2C = 10.24 pg DNA인 보리를 사용하였으며, 보리와 마늘을 함께 chopping하여 Dolezel (1995)의 방법에 의해 G1 피크의 평균값으로 마늘의 2C DNA 함량을 계산하였다.

### 2C DNA content of garlic

$$= \frac{\text{G1 peak mean of garlic}}{\text{G1 peak mean of barley}} \times 10.24 \text{ (pg)}$$

## 결과 및 고찰

### 배양체 상태에 따른 마늘 신초의 생장

배양체의 상태에 따라 생물반응기 내 신초의 증식이 크게 달랐다. 신초의 잎을 제거한 것이 신초의 잎을 제거하지 않고 chopping하여 배양한 것에 비해 생체중은 29배, 증식된 신초의 수는 22배 정도 높았으며 잎을 제거하지 않고 배양한 경우 과수화율이 90.1%에 달해 증식 효율이 현저히 떨어

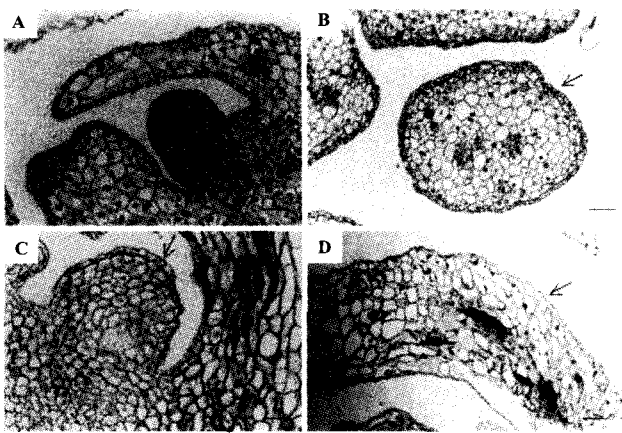
**Table 1.** Effect of explant types on multiple shoot proliferation of garlic after 3 weeks of culture.

Explant type <sup>z</sup>	Total fresh wt. (mg)	Total no. shoots <sup>y</sup>	Hyperhydricity (%)
Shoot removal	796,11.3	792.0	2.3
Without shoot removal	2678.9	35.8	90.1
<i>P</i> - value	***	***	**

<sup>z</sup> Twenty explants were cultured in each treatment.

<sup>y</sup> Vitrified shoots were excluded.

ns, \*, \*\*, \*\*\* Nonsignificant or significant at P≤0.05, 0.01, 0.001, respectively.

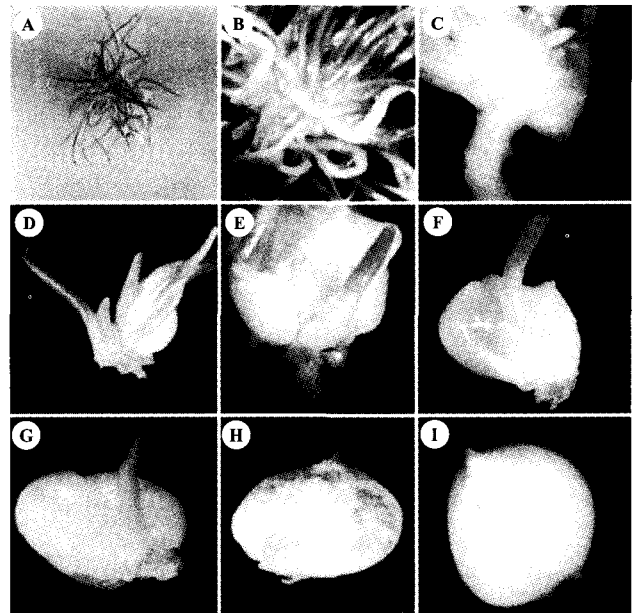


**Figure 1.** Histological observations of normal and vitrified shoots of garlic as affected by with or without shoot removal before the culture (bar = 50  $\mu$ m). A, Longitudinal section of a normal shoot meristem. Cells are nucleated and uniform in size and shape. Epidermis is well developed; B, Transverse section of a normal shoot leaf; C, Longitudinal section of a vitrified shoot meristem. Cells are irregular in size and shape; D, Irregular cell layers in a vitrified leaf.

졌다 (Table 1). 정상적인 싹에서는 microbulb의 형성이 정상적으로 이루어졌으나, 과수화 된 싹에서는 microbulb의 형성이 전혀 이루어지지 않았다 (data not shown). 싹 정단 부위의 세포 조직을 비교하였을 때, 정상 싹에서는 분열조직의 세포의 핵이 뚜렷하였고 세포의 크기와 모양이 균일하였던 반면, 과수화 된 싹에서는 핵이 뚜렷하게 염색되지 않았으며 세포의 크기와 모양도 균일하지 않았다 (Figure 1).

생물반응기에서 배양된 마늘 microbulb의 형태 발달

기내에서 마늘의 배양은 크게 증식과 비대의 두 단계로 나누어진다. 이는 다시 싹 증식, microbulb의 형성준비,



**Figure 2.** Morphological development of microbulb formation of garlic during 12 weeks of bioreactor culture. A, Active shoot proliferation after 3 weeks. Multiple shoots were cultured on MS medium supplemented with 2% sucrose; B, Basal part of multiple shoots of garlic; C, Basal part of the shoot just before microbulb formation; D-F, Leaf of plantlet is short by thickening, forming a small microbulb during 4-7 weeks of culture; G-H, Complete formation of a microbulb after 8-9 weeks of culture; I, Enlargement of a single microbulb after 12 weeks of culture.

형성 및 비대의 4단계로 세분화된다 각 단계별 발달에 대한 상세한 설명은 Table 2와 같다. 싹 배양의 1단계에서는 다싹의 증식이 왕성하게 이루어지며 (Figure 2A, B), 2단계에서는 증식속도가 떨어지면서 배양체의 상부 잎이 두꺼워지고 anthocyanin의 축적이 이루어지는데 (Figure 2C, D), 이는 microbulb의 형성을 위한 준비단계로 보인다. 배양 6주 후에는 이전에 비해 2배 이상 빠른 싹의 증식이 이루어지며 싹이 굵고 길어져 구 형성의 조짐을 보였다.

**Table 2.** Illustrations of developmental stages of microbulb formation of garlic.

Culture stage	Process	Culture period (weeks)	Developmental stages of microbulb formation
I	Proliferation stage	1-3	Active proliferation of multiple shoots of garlic
		4	Only a little proliferation and accumulation of anthocyanin in the medium, development of thick leaves on the upper part
II	Preparation stage of microbulb formation	5 - 6	Proliferation rate is fast, more than two times of proliferation stage. The shoot leaf is long, thick, and green in color. Anthocyanin formed amply. The type of appearance of plantlets indicates the initiation of microbulb formation.
		7	Microbulb formation but incomplete. Upper part of the plantlet becomes thick, short, and a little faded in color, but plantlets of basal part get thick and long.
III	Bulb formation stage	8 - 9	A completion of microbulb formation
IV	Bulb growth stage	10 - 12	Enlargement of microbulbs

3단계인 microbulb의 형성 단계(배양 후 7주)에서는 길어진 신초의 잎이 짧아지면서 구를 형성하기 시작하나 구 모양은 뚜렷하지 않았다 (Figure 2E, F). 배양 8주가 경과하면서 완전한 작은 구의 모습을 갖추기 시작하였고 9주 후에는 microbulb의 형성이 이루어 졌으며 (Figure 2G, H), 배양 10주 후 부터는 microbulb의 비대가 시작되어 12주 후에는 직경 0.1 g 이상의 microbulb가 형성되었다 (Figure 2I).

마늘 microbulb의 형성은 안토시아닌 색소의 형성과 함께 잎과 신초의 기부가 굵어지면서 시작되었다. 안토시아닌의 합성은 식물의 발달 경로의 한 부분으로 기관과 조직의 발달 과정에서 축적된다고 알려져 있어 (Stephen and Howell 1997), 마늘의 경우에도 안토시아닌의 축적이 microbulb의 형성에 영향을 미친 것으로 생각된다.

#### 마늘 microbulb의 세포 조직 관찰

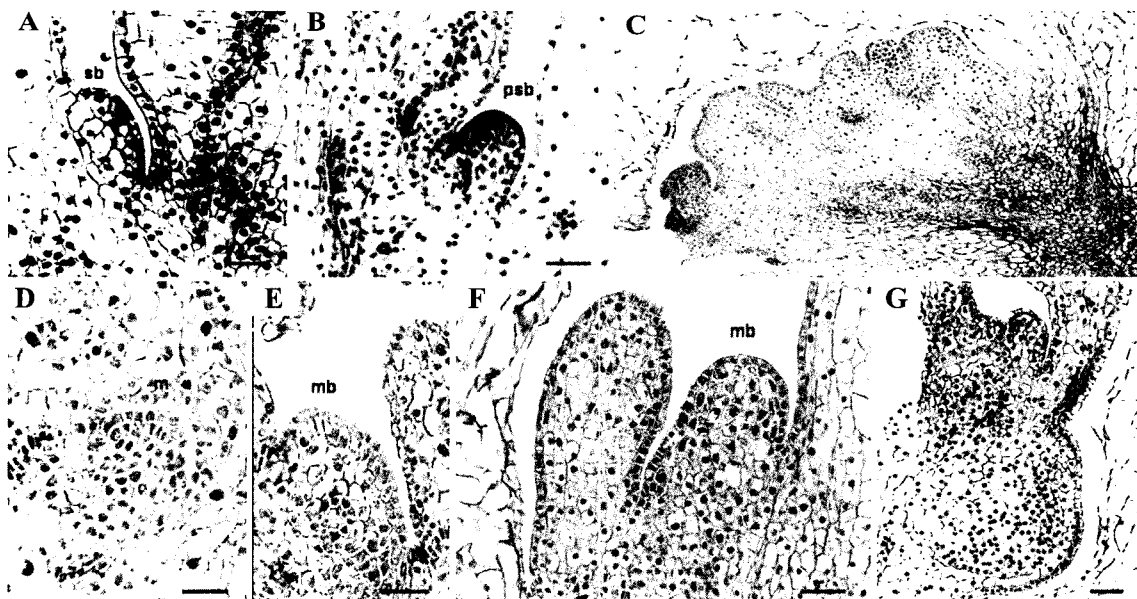
마늘의 신초로부터 microbulb가 형성되는 과정을 신초와 microbulb의 세포 조직의 변화를 통해 관찰하였다. 신초 배양 3주 후 표피의 부정아 세포에서 분열이 활성화되면서 부정아가 비대되었고 (Figure 3A, B). 배양 4주 후에는 이러한 단일 부정아와 같은 부정 원기가 다수 형성되었다 (Figure 3C). 신초의 분열조직 (Figure 3D)에서 수층과 병층으로 분열이 일어나 배양 4~6주 후에는 크게 비대되었다 (Figure 3E, F). 배양 7주 후 작은 microbulb를 형성하였는데 (Figure 3G), 이 시기에는 성장점을 구성하고 있는 조

직의 세포질이 충만하였으며, 핵이 뚜렷이 구분되었다.

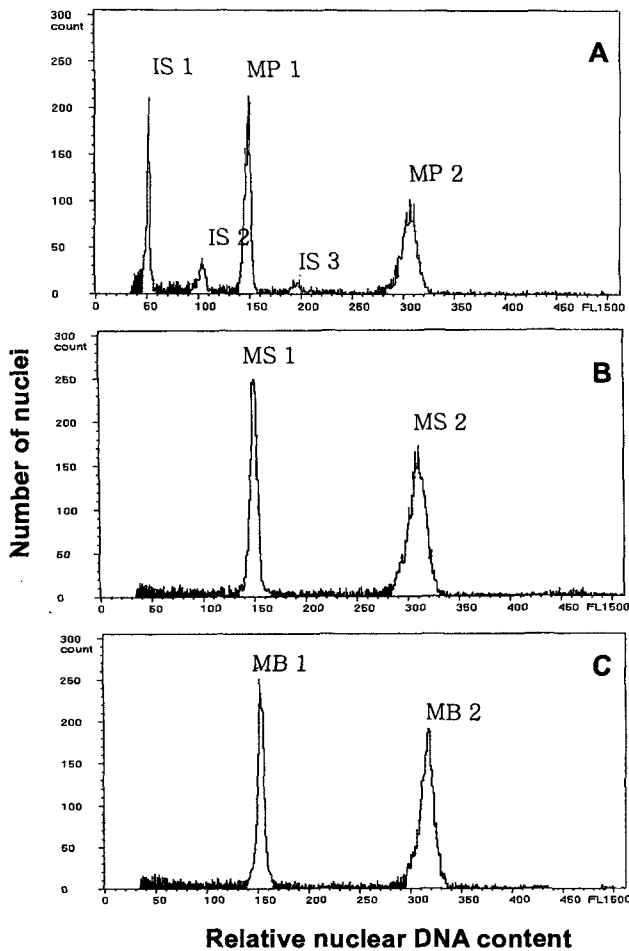
이 같은 기내 구 형성의 결과는 양파의 기내 구 형성과 *Crinum macowanii*의 twin scale에서 구의 형성 과정과 동일하였는데, 표피에서 계속적인 병층분열과 동시에 수층분열이 일어나 이 분열조직이 부풀 후에 구 형성 단계로 진행되는 것은 마늘과 같은 구근식물에서 일어나는 일반적인 현상이라고 하였다 (Hussey and alavigna 1980; Slabbert et al. 1993). De Bruyn 등 (1992)도 아마릴리스의 twin scale에서 소자구 형성시 부정아가 돌출되면서 이것이 점점 부풀며 분화하는데, 이때 핵이 명확히 구분된다고 하였다.

#### 배수성 검정

재래종 마늘 (단양 산: 모주), 이로부터 유도된 신초, 그리고 생물반응기에서 생산된 microbulb의 핵을 추출하여 상대적인 DNA 함량을 측정 한 결과, 대부분의 핵은 2C DNA 함량 (G1)을 가장 많이 가지고 있었으며, 4C DNA 함량 (G2)도 상당량을 포함하고 있었다 (Figure 4). 일반적으로 어리고 분열이 왕성한 조직에서 2C, 4C DNA 함량이 많으며, 오래되고 분화가 많이 진행된 조직에서는 64C까지의 배수성 수준을 보이는 것으로 보아 (Wendy and Adelheid 1998), 기내 식물체의 세포분열이 왕성히 일어나고 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 신초와 microbulb의 피크 모두 모주 식물의 상대적인 피크와 동일한 위치에서 나타나 배수성의 변이가 없는 것으로 나타났다. Novak (1980)는 마늘의 캘러



**Figure 3.** Histological observations through longitudinal section of adventitious shoots and microbulbs of garlic cultured in bioreactors (bar = 50  $\mu$ m). A, Adventitious shoot bud formation (sb) after 3 weeks; B, Protuberance of adventitious shoot bud (psb); C, A group of meristemoids after 4 weeks of culture; D, Meristem (m) of garlic shoot; E, Inner periclinal divisions and simultaneous anticlinal division in the epidermis produced a meristematic bulge (mb) after 4-5 weeks of culture; F, Longitudinal section of a thick shoot (just before the microbulb formation): Well developed meristematic bulge (mb) after 5-6 weeks; G, Bulblet development after 7 weeks.



**Figure 4.** Flow cytometric histograms of garlic. A, Mother plant of garlic (MP) and barley (IS): IS 1, 2, 3 represent nuclei with 2C, 4C and 8C DNA content in barley. MP 1 and MP 2 represent G1 (2C) and G2 (4C) nuclei in garlic; B, In vitro multiple shoot of garlic cultured for 20 months. MS 1 and MS 2 represent G1 and G2; C, Microbulbs of garlic formed from the shoot: MB 1 and MB 2 represent G1 and G2.

스로부터 재생된 식물체의 50% 이상에서 이수체와 키메라와 같은 염색체 이상을 가진다고 하였으나, 싹초 배양에서는 변이를 보이지 않아 캘러스 배양에 비해 유전적으로 안정적임을 증명하였다. 따라서 기내배양에서 생산된 microbulb는 새로운 모주로 사용될 수 있으며 유전적으로도 안정하다는 것을 알 수 있었다.

**적 요**

마늘 (*Allium sativum* L.) 다싹초를 생물반응기를 이용, sucrose 2%가 포함된 MS 배지에서 3주간 증식시킨 후 microbulb의 형성을 위해 NAA 0.1 mg/L와 sucrose 11%가 포함된 MS 배지에서 9주간 배양하였다. 다싹초 증식의 경우, 잎을 제거하지 않았을 때 90% 이상이 과수화되었고 과수화 된 싹초의 세포는 크기와 형태가 일정하지 않았으며

microbulb의 형성도 이루어지지 않았다. 싹초 배양 3주 후 표피의 부정아 세포에서 분열이 활성화되면서 부정아가 비대되었고 싹초의 분열조직에서 수층과 병층으로 분열이 일어나 크게 비대된 후 배양 7주 부터 microbulb를 형성하였다. Ploidy analyzer를 이용한 배수성 검정에서 다싹초와 microbulb의 피크 모두, 모주 식물의 상대적인 피크와 동일한 위치에서 나타나 배수성의 변이가 없는 것으로 나타나 배양체가 모주 식물과 유전적으로 동일함을 입증하였다.

**사 사**

본 연구는 한국 과학재단지정 충북대학교 첨단원예기술 개발센터 지원에 의한 것임.

**인용문헌**

Bhojwani SS, Choen D, Fry PR (1983) Production of virus free garlic and field performance of micropropagated plants. *Scientia Hort* 18: 39-43  
 De Bruyn MH, Ferreira DI, Slabbert MM, Pretorius J (1992) In vitro propagation of *Amaryllis belladonna*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 31: 179-184  
 Dolezel J (1995) Flow cytometry principles and applications in mutation breeding. p. 1-25. Fourteenth IAEA/FAO, Interregional training course on advances in plant mutation techniques, Vienna, Austria  
 Hussey G, Falavigna A (1980) Origin and production of in vitro adventitious shoots in the onion *Allium cepa* L. *J Exp Bot* 31: 1675-1686  
 Ket NV, Hahn EJ, Park SY, Chakrabarty D, Paek KY (2004) Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biol Plant* 48: 339-344  
 Kim EK, Hahn EJ, Murthy HN, Paek KY (2003) High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 73: 231-236  
 Kim E.K., Hahn EJ, Murthy HN, Paek KY (2004) Enhanced shoot and bulblet proliferation of garlic (*Allium sativum* L.) in bioreactor systems. *J Hort Sci Biotech.* 79: 818-822  
 Lee EM, Lee YB (1994) Systematic propagation of high quality garlic (*Allium sativum* L.) through shoot apical meristem culture. II. Effects of sucrose concentration and nitrogen source on in vitro formation of bulblets. *Kor J Plant Tiss Cult* 21: 193-199  
 Lian ML, Chakrabarty D, Paek KY (2002) Growth and uptake of sucrose and mineral ions by bulblet of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' during bioreactor culture. *J Hort Sci Biotech* 77: 253-257  
 Matsubara S, Chen K (1989) In vitro production of garlic plants and field acclimatization. *HortScience* 24: 727-734

- Mishiba K, Mii M (2000) Polysomaty analysis in diploid and tetraploid *Portulaca grandiflora*. *Plant Sci* 156: 213-219
- Moriconi DN, Conci VC, Nome SF (1990) Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. *Phyton* 51: 145-151
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Novak FJ (1980) Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. *Plant Sci Lett* 84: 250-260
- Palomino G, Dolezel J, Cid R, Brunner I, Mendez I, Rubluo A (1999) Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term in vitro culture. *Plant Sci* 141: 191-200
- Park SY, Murthy HN, Paek KY (2000) Mass multiplication of protocorm-like bodies (PLBs) using bioreactor system and subsequent regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 63: 67-72
- Slabbert MM, de Bruyn MH, Ferreira DI, Pretorius J (1993) Regeneration of bulblets from twin scales of *Crinum macowanii* in vitro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 33: 133-141
- Stephen H, Howell H (1997) Molecular genetics of plant development. p. 92-93. Cambridge University Press
- Such SK and Park HG (1995) Plant regeneration from the culture of garlic root explants. *J Kor Soc Hort Sci* 36: 31-37
- Wendy EJ, Adelheid RK (1998) Ploidy identification using flow cytometry in tissues of *Dendrobium* species and cultivars. *Lindleyana* 13: 11-18

(접수일자 2004년 10월 12일, 수리일자 2004년 12월 6일)