

## 마늘 배양에 있어서 신초원기 유도

최주수\* · 이복규 · 허만규

동의대학교 분자생물학과

Received February 20, 2006 / Accepted April 27, 2006

**Induction of Shoot Primordium in Culture of Garlic (*Allium sativum* L.).** Joo Soo Choi\*, Bok Kyu Lee and Man Kyu Huh. Department of Molecular Biology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – Cultivated garlic, *Allium sativum* L. is economically important for leaves and bulbs, which historically were used in Korea for spices and condiments of Korean food as well as medicine crops. This experiment was carried out to investigate the effect of development and differentiation on culture of *A. sativum* (cv: white 6) by explant position, hormone composition and sucrose concentration in culture media. Culture method was investigated to induce shoot primordium. Culture efficiency was better with lower tissue of foliage leaf in explant position and on the medium with NAA 0.02 + BAP 1.0 mg/l in hormone composition than any other. Precocious shoot and callus were induced from shoot apex. Shoot was efficiently differentiated on 4,000 mg/l sucrose with increasing concentration of BAP. Shoot primordium was also induced with liquid rotary culture by histological observation. Rhizoid was induced from callus tissue cluster on medium with NAA 0.02 + BAP 2.0 mg/l.

**Key words** – Garlic (*Allium sativum* L.), liquid rotary culture, shoot primordium.

### 서 론

마늘(*Allium sativum* L.)은 중앙아시아 원산의 백합과에 속하는 2배체(2n = 16)의 다년생 식물로 지하부에 형성된 6~10여개의 소인경과 화경정부에 착상하는 주아에 의하여 증식하는 영양번식성 식물로 독특한 풍미를 가질 뿐만 아니라 자양강장 효과도 있으므로 식용 또는 향신료로 세계 각지에 널리 재배되고 있다[1].

마늘은 파속(genus *Allium*)에 속하며 세계에서 양파 다음으로 많이 재배된다. 우리나라의 채소 작물 중 조미료로 많이 이용되고 있는 마늘은 채소로서 뿐만 아니라 약용으로도 그 이용가치가 높아 한방에서 황근소담, 강압강지, 소화정장 등에 널리 이용되고 있다. 마늘의 번식은 종자가 형성되지 않아 인경과 주아를 이용하여 영양번식을 주로 하기 때문에 종묘의 수가 다량 필요하며 감염된 모주로부터 번식을 계속할 경우 후대작물이 virus에 감염되어 20~40%의 수확량이 감소되고 마늘 구형의 열악화로 상품가치를 저하시키므로 virus-free한 모주를 육성할 필요가 있게 된다[5,9,11,12,20].

현재 생산지에서 재배되고 있는 마늘의 거의 모두가 virus에 감염되어 있는 실정으로 포장에서 virus-free 개체를 선발한다는 것은 거의 불가능에 가까우므로 조직배양에 의한 대량증식법을 모색하게 되어 지금까지 마늘의 경정배양과 캘러스배양에서 식물체 분화와 대량증식에 성공한 이후 virus-free 종구의 대량생산에 연구가 집중되어 효과적인 결

과를 많이 얻고 있다[1,4,6,7,19-21].

최근 마늘에서도 식물 virus병 대책으로서 경정배양에 의한 virus-free 종묘의 생산이 실용화되고 있으나 1개의 경정으로는 수 개의 식물체 획득에 지나지 않으므로 대량증식의 경우에는 많은 복잡한 경정 적출 작업과 캘러스 배양에 따른 변이체 발생 등의 문제 해결을 위하여 유전자적 변이가 없는 신초원기법[3,4,8,14,16-18]이나 경정유래 캘러스로부터 다아체[12,13]를 형성시키는 방법 등이 거양되고 있다.

본 실험에서는 마늘의 개체 재생을 위하여 치상부위의 상이에 의한 배양효과와 식물생장조절물질(이하 호르몬) 및 당조성이 경정조직의 배양과 분화에 미치는 영향을 검토하고 또한 신초원기 유도를 위한 효과적인 배양법을 확립하는 기초 자료를 얻고자 하였으며 신초원기 유도에 따른 배양체의 조직학적 관찰을 행하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험 재료

일본 명성대학 농학부 부속농장(홍적사양토)에 재배하고 있는 마늘(품종 white 6편)을 수확하여 건조망에 넣어 통풍음건하여 5°C의 냉암 조건하 2개월간 저장하여 휴면타파하여 공시재료로 사용하였다.

#### 실험 방법

사용하는 기구 및 도구는 건조살균 및 고압멸균 또는 UV lamp 하에서 1시간 이상 살균하여 무균상태로 하였다.

실험재료는 clean bench 내에서 70% alcohol에 수초 간,

\*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1527, Fax : +82-51-890-1521

E-mail : choijs@deu.ac.kr

tween 20을 2~3 방울 첨가한 sodium hypochlorite 용액(활성염소 1.0 %)에 15 분간 침지 소독한 후 멸균수로 수회 수세하였다. 조직의 갈변을 방지하기 위하여 산화방지제(ascorbic acid 50 mg/l + citric acid 50 mg/l)에 조직을 침지 처리하여 배지에 치상하였다.

배지는 Table 1의 Takano-Meijo 기본배지(이하 TM 배지)로 배양액 조성은 총이온용량이 30 me/l로 하였고 호르몬조성의 영향을 알기위하여 모두 NAA 0.02 mg/l과 BAP 0.2, 1.0, 2.0을 각각 첨가한 3종류로 autoclave 후 pH 5.7로 조정하였다.

Table 1. Composition of Takano-Meijo medium

Inorganic	mg/l		mg/l					
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	69.00	MnSO <sub>4</sub> · 4~5H <sub>2</sub> O	1.50					
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	530.40	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.43					
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	708.00	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.20					
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	553.50	NaMo <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.02					
		CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.05					
		Fe-EDTA	20.00					
<b>Organic</b>								
Nicotinic acid	10.00	Glycine	5.00					
Thiamine-HCl	1.00	Cysteine	40.00					
Pyridoxine-HCl	1.00	Glutamine	50.00					
Myo-inositol	200.00							
Adenine sulfate	30.00							
Sucrose	20000.00 (or 40000.00 subculture)							
Phytigel(solid medium)	2500.00							
<b>Growth regulators</b>								
NAA	0.02							
BAP	0.20							
	1.00							
	2.00							
<b>Composition of culture(% , me/l : ion capacity)</b>								
	Chemicals							Total
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	
%	20	15	15	2	13	20	15	100
me/l	6	4.5	4.5	0.6	3.9	6	4.5	30

Table 2. Redifferentiation of explants on solid medium

Inoculation position	Hormone combination		Inoculation numbers	Differentiation of explant (EA)		Differentiation rate (%)	Plot
	NAA	BAP		4 weeks	8 weeks		
Shoot apex	0.02	0.2	22	5	5	23	A
	0.02	1.0	25	8	10	40	B
	0.02	2.0	20	6	6	30	C
Lower tissue of foliage leaf	0.02	0.2	35	17	19	54	D
	0.02	1.0	35	22	24	69	E
	0.02	2.0	35	19	20	57	F
Storage leaf (Scaly leaf)	0.02	2.0	35	0	0	0	G
	0.02	1.0	35	0	0	0	H
	0.02	2.0	35	0	0	0	I

재료의 치상부위에 따른 배양효과의 차이를 검토하기 위하여 치상조직을 달리하여 즉, (1)경정조직(경정조직을 포함한 저반부 크기 0.5~1 mm), (2) 보통엽 중하부조직 (직경 3~5 mm, 두께 1 mm 윤절), (3) 저장엽(인편 3~5 mm 각절)으로 하여 3종류로 하여 합계 9 처리구(A~I)로 하였다. 배양은 고체 배지에 치상하여 3주마다 새로운 배지에 이식하였고 배양조건은 25°C, 5000 lux로 하였다. 신초원기(shoot primordium) 유도를 위하여 A, B, C 구에 phytigel을 제거한 액체배지에 경정조직을 치상하여 같은 조건하에서 1분간 2회 정도 회전배양 하였다.

배양중인 배지의 당 농도가 경정조직의 재분화 및 shoot 형성에 미치는 영향을 알고자 A, B, C구에 배양한 경정조직이 1~2 cm 정도로 성장한 조직괴를 3 mm 전후의 크기로 조정하여 sucrose 농도만을 2배(40000 mg/l)하여 침투압을 높인 배지에 계대배양하여 동일조건하에서 배양하여 shoot 형성을 조사하였다.

신초원기 유도를 위한 배양체의 조직학적 관찰을 위하여 배양된 조직을 FAA액에 고정하여 paraffin 절편법에 의한 두께 10 μm의 연속 절편을 만들어 염색은 0.5% safranin 용액과 0.5% first-green FCF 용액으로, canada balsam으로 봉입하여 영구표본을 제작하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

치상부위 및 배지조성에 따른 고체배지에서의 이식절편체의 발육 및 분화양상과 callus 유기를 포함하여 shoot 형성 등 분화율(탈분화 및 재분화율)을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. 저반부를 포함한 경정조직을 배양한 A구와 C구에서는 4주 후에 callus 유기를 포함한 분화 및 발육한 식물체는 모두 5개체와 6개체였으며 8주 후에도 변화지 아니하여 발육(분화 포함)율은 23% 및 30%로 낮았다. BAP가 1.0 mg/l 첨가된 B구에서는 4주 후에 8 개체 분화하였으며(Fig. 1), 8주 후에는 precocious shoot가 발육되는(Fig. 2) 등 10개체로 되었다. 발육(분화)율도 40%로 저반부를 포함한 경정조직의 배

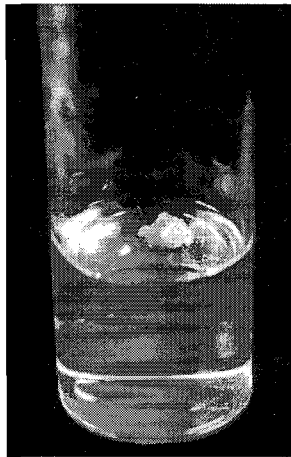


Fig. 1. Differentiated tissue cluster after 4 weeks on inoculation.



Fig. 2. Precocious shoot and callus induced from shoot apex and shoot differentiated from callus after 8 weeks on inoculation.

양구에서는 가장 높은 발육율을 보였고 생육도 활발하였다. 또한 B구에서는 근원 쪽에 울퉁불퉁한 조직괴가 발생하였다

(Fig. 2).

보통엽 중하부조직을 호르몬 조성을 달리한 3구(D, E, F)에 각각 35 개체를 치상하여 4주 후에 조사한 결과 분화 개체수는 17, 22, 19이였으며 8주 후에는 각각 19, 24, 20개체로 증가하여 분화율은 54, 69, 57%로 다른 조직의 치상부위와 비교하여 가장 높았으며 BAP가 1.0 mg 첨가된 E구가 가장 양호하였다.

저장엽(인편엽)을 35개체씩 3구(G, H, I)에 치상한 결과 분화 및 발육개체는 어느 구에서도 확인되지 아니하였고 치상한 배양체도 갈변 외에는 별다른 변화를 보이지 아니하였다.

신초원기 유도를 위하여 Table 2의 고체배지와 동일조성에서 Phytigel을 제거한 액체배지에 경정조직을 회전 배양한 결과(Table 3)는 어느 실험구에서도 낮은 분화율을 보였으나 BAP가 다소 높게 첨가된(1.0~2.0 mg/l) 실험구에서 다소 양호하였다. NAA 농도를 0.02 mg/l로 일정하게 처리할 때 BAP 첨가에 따라 분화율은 개선되었다. 또한 비대한 조직괴는 외부조직이 신초원기가 유도될 때와 같이 Dome상의 표면에 울퉁불퉁한 녹색돌기를 갖으며 소집괴를 형성하였다(Fig. 3).

형성된 조직괴를 사용하여 조직학적 관찰을 한 결과 NAA 0.02 mg/l와 BAP 1.0 mg/l을 첨가한 B구의 조직절편은 액포가 발달한 대형의 세포와 세포질이 풍부한 소형의 표층구조로 된 분열조직을 이룬 다른 2종류의 조직이 혼잡하여 관찰되었다. 또한 표층에 돌기상의 조직이 형성되어 1차 신초원기, 2차 신초원기의 세포분열상을 보이고 있다(Fig. 6).

배지 중의 당 농도가 경정조직의 분화 및 shoot 형성에 미치는 영향을 알기위하여 Table 2의 A, B, C구에 배양한 경정조직이 1~2 cm 정도로 발육한 조직괴(Fig. 1)를 3 mm 전후의 크기로 조정하여 sucrose 농도만을 2배(40000 mg/l)하여 침투압을 높인 배지에 계대배양하여 동일조건하에서 배양하여 shoot 형성율을 조사한 결과는 Table 4와 같았다. NAA 농도를 0.02 mg/l로 일정하게 처리할 때 BAP 농도가 1.0 mg/l 일 때 shoot 형성율이 가장 높았다.

Table 3. Redifferentiation and shoot primordium induction on liquid medium

Hormone combination (mg/l)		No. of explant	No. of shoot primordium induction	Rate of shoot primordium induction (%)	Contamination (EA)
NAA	BAP				
0.02	0.2	14	2	14	3
0.02	1.0	14	4	29	2
0.02	2.0	16	5	31	3

Table 4. Shoot formation rate from tissue cluster after subculture

Hormone combination (mg/l)		No. of inoculation	No. of shoot formation	Rate of shoot formation (%)	Contamination (EA)
NAA	BAP				
0.02	0.2	15	3	20	2
0.02	1.0	21	11	52	2
0.02	2.0	14	9	64	0

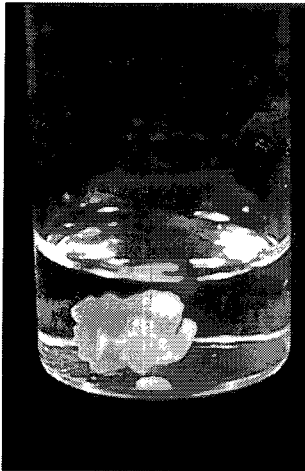


Fig. 3. Shoot primordia induced 4 weeks after inoculation on liquid-rotary-culture.



Fig. 4. multi-shoots differentiated from tissue cluster on medium with NAA 0.02 + BAP 1.0 mg/l.

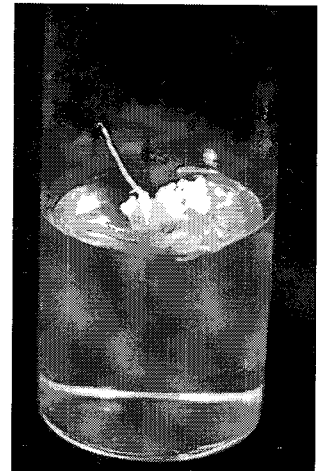


Fig. 5. Rhizoid induced from tissue cluster on medium with NAA 0.02 + BAP 2.0 mg/l.

고찰

Tanaka 등[14,15]은 *Haplopappus*에서 체세포가 배양에 의하여 부정배로 되는 중간 단계의 dome 모양의 소집괴를 이루는 조직체로 callus와 부정배의 중간단계의 효율 좋고 유전적으로 안정적인 증식을 하는 조직체로 소집괴가 5~10 mm 정도가 되었을 때 분할하여 새로운 소집괴(2차 신초원기)를 형성하여 증식하는 조직을 shoot primordium(신초원기)라고 명명하였다. 본 연구 결과와 신초원기 유도에는 저농도의 호르몬 단독 또는 혼합첨가가 필요하며 혼합할 때에는 NAA와 BAP의 비에서 NAA 농도보다 BAP의 농도가 상대적으로 높은 배지에서 shoot primordia가 유도된다는 보고[2,3,8,10,14,15]와 일치하는 경향을 보였다.

Shoot primordia가 유도될 때 배양한 dome모양의 경정에 소구체의 울퉁불퉁한 녹색돌기가 형성되어 이것(1차 신초원기)으로부터 계속해서 같은 모양의 다른 조직(2차 신초원기, 3차 신초원기 등)을 만든다는 보고[2,3,8,10,14]와도 같은 양상이었다. 따라서 이 결과는 마늘에서도 신초원기가 형성될 수 있음을 보여준다(Fig. 3).

식물체의 분화 및 shoot 형성에 미치는 sucrose의 농도는 sucrose의 농도를 2배한 배지의 shoot 형성율이 다소 양호하였으며(Table 2), BAP 첨가농도가 다소 높아짐에 따라 양호한 경향을 보였다. 특히 NAA 0.02와 BAP 1.0 mg/l 첨가된 배지의 조직괴는 많은 수의 shoot가 형성되었으며(Fig. 4), BAP 2.0 mg/l 구에서는 가근의 형성이 보였다(Fig. 5) [7,13]. 이는 마늘을 재료로 shoot 형성에 sucrose 농도가 다소 높은 것이 양호하다는 결과와 같은 경향이였다[7,11,13].

마늘배양에서 shoot의 형성에 NAA보다 상대적으로 조금 높은 비율의 BAP가 혼합된 배지에서 양호하며 유사한 실험으로 Suh와 Park의 결과[12,13,]와 일치하는 경향이였으나,

BAP가 상대적으로 높은 배지에서 shoot 뿐만 아니라 root가 분화되어 root의 형성에는 BAP의 농도보다 NAA의 농도가 약간 높은 배지에서 효과적이라는 결과[3,6]와 일치하지 않는 경향이였다.

배양의 경과에 따라 조직괴를 조직학적으로 관찰하여 본 바로는 B구에서 발생한 조직괴를 당 농도를 2배한 배지에서 계대배양한 결과 외관상 callus상의 조직괴가 증식되었고 분열조직의 세포층은 안쪽으로 액포가 발달한 대형의 세포와 바깥쪽으론 세포질이 풍부한 소형으로 표층구조를 이루고 있었다. 또한 액체배지에서 형성된 신초원기상 조직에서는 분열세포나 내부의 세포층에도 비교적 세포질이 풍부한 세포가 많은 것이 관찰되었고 1차 신초원기, 2차 신초원기인 돌기상의 조직이 형성됨이 관찰되어(Fig. 6), 유도된 조직괴가 신초원기라고 사료된다[2,3,10,14,15]. 이 결과는 마늘에서도 식물 virus병에 대한 대책으로 진행되는 연구, 또는 복잡한 경정 적응 작업과 캘러스 배양에 따른 유전자 변이가 발생하는 등 여러 문제점을 파타하여 virus-free한 형질의 식물체 획득에 기여할 것으로 판단된다.

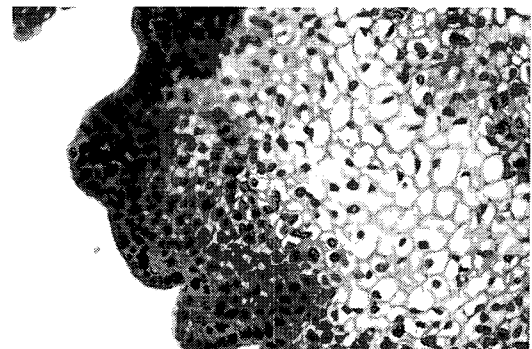


Fig. 6. Tissue-like-protuberance (shoot primordia) induced on surface of tissue cluster.

## 요 약

경제적인 채소류 중 향신료뿐만 아니라 약용으로서 이용 가치가 많은 마늘은 영양번식성 작물로 virus에 감염되어 있으므로, 조직배양에 의하여 마늘의 virus-free한 개체의 생산을 목적으로, 배양부위의 상위에 따른 배양효과의 차이와 호르몬 조성과 당의 농도가 조직배양의 생육·분화에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 신초원기 유도를 위한 배양조건을 검토하였으며, 배양체의 조직학적 관찰을 행하였다. 치상부위 별로 보통엽 중하부조직이 배지조성에는 NAA 0.02 + BAP 1.0 mg/l 첨가배지가 발육과 분화에 다소 양호하였다. Shoot 분화에는 sucrose 40 g 첨가구에서 BAP의 증가에 따라 shoot형성이 다소 양호하였으며 NAA 0.02 + BAP 0.2 mg/l 첨가구에서는 가근이 유도되었다. 액체 회전 배양에서 신초원기라고 판단되는 조직이 유도되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2004 학년도 동의대학교 학술연구조성비의 지원으로 수행되었으며 연구비지원에 감사드립니다.

## References

- Bojwani, S. S., D. Cohen and P. R. Fry. 1982. Production of virus free garlic and field performance of micropropagated plants. *Scientia Hort.* **18**, 39-43.
- Choi, J. S. 1994. Mass propagation by shoot apex culture through induction of shoot primordia in some fruit trees. 1. Shoot apex culture of Apple trees. *J. Inst. Bio-Prod. Res., Dongeui Univ.* **11**, 65-72.
- Choi, J. S. and M. K. Huh. 2004. Micropropagation by leaf blade culture through induction of callus and shoot primordium in *Opiopogon japonicus* Ker-Gawl. *Donguei Nonjip.* **40**, 235-242.
- Choi, S. Y., K. Y. Paek and J. T. Jo. 1993. Plantlet production through callus culture in *Allium sativum* L. *J. Kor. Soc. Hort.* **34**, 16-28.
- Chung, H. D. and M. U. Chang. 1979. Studies on the infection of virus in garlic, *Allium sativum* L. in Korea. *J. Kor. Soc. Hort.* **20**, 123-133.
- Lee, E. M. and Y. B. Lee. 1994a. Systematic propagation of high quality garlic (*Allium sativum* L.) through shoot apical meristem culture. 1. Organogenesis from in vitro cultured shoot tip. *Korean J. Plant Tissue Culture* **21**, 161-166.
- Lee, E. M. and Y. B. Lee. 1994b. Systematic propagation of high quality garlic (*Allium sativum* L.) through shoot apical meristem culture. 2. Effect of sucrose concentration and nitrogen source on in vitro formation of bulblets. *Korean J. Plant Tissue Culture* **21**, 193-199.
- Nagai, T., Y. Nomura and K. Oosawa. 1989. Induction of shoot primordia and plantlet formation in melon. *J. Japan. Soc. Hort. Sci. Abs.* **58**, 208-209.
- Novak, F. J., L. Havel and J. Dolezel. 1986. *Handbook of Plant Cell culture, Chapter 15; Allium.* pp. 418-456, V4, Y.P.S Bajai, ed, Springer-Verlag, New York
- Okada, M. and M. Matsumoto. 1990. Shoot primordia induction and plant regeneration in *Allium chinense*. *J. Japan Soc. Hort. Sci. Abs.* **59**, 284-285.
- Park, C. H., M. S. Lee, D. C. Choi and H. C. Lim. 1993. Effect of 1-Naphthaleneacetic acid and sucrose on bulblet formation in floral and vegetative bud culture of garlic (*Allium sativum* L.). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **34**, 248-256.
- Suh, S. K. and H. G. Park. 1993. Rapid multiplication through immature bulbil cultures of garlic. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **34**, 173-178.
- Suh, S. K. and H. G. Park. 1995. Plant regeneration from the culture of garlic root explants. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **36**, 31-37.
- Tanaka, R. and H. Ikeda. 1983. Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* (2n=4) by shoot tip cloning. *Japan. J. Genet.* **58**, 65-70.
- Tanaka, R., H. Ikeda, K. Taniguchi and A. Watanabe. 1983. Maintenance and Mass-propagation of an aneuploid in annual *Haplopappus gracilis* (2n=4) by shoot tip cloning. *Proc. Japan. Acad.* **59**, 359-362.
- Tanaka, R., K. Taniguchi and I. Fujishige. 1988. Artificial induction of clonal tetraploids in an annual plant, *Haplopappus gracilis* (2n=4), by using tissue culture shoot primordia. *Japan J. Genet.* **63**, 113-125.
- Tanaka, R., K. Taniguchi and Y. Kamisugi. 1985. Induction of single cell stage in tissue cultured shoot primordia of *Haplopappus gracilis* (2n=4), a preliminary report. *Japan J. Genet.* **60**, 405-410.
- Taniguchi, K., R. Tanaka, N. Ashitani and H. Miyagawa. 1988. Freeze preservation of tissue-cultured. Shoot primordia of the annual *Haplopappus gracilis*(2n=4). *Japan J. Genet.* **63**, 267-272.
- Vander Valk P., O. E. Scholten, F. Verstappen, R. C. Jansen and J. J. M. Dons. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration zygotic embryo-derived callus of three *Allium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **30**, 181-191.
- Walkey, B. G. A., M. J. W. Webb, C. J. boll and A. Miller. 1978. Production of virus free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem tip culture. *J. Hort. Sci.* **62**, 211-220.
- Yang, S. G., H. S. Lee, W. J. Jeong, S. R. Min and J. R. Liu. 1993. Production of virus-free microbulbs of garlic (*Allium sativum* L.) by in vitro culture of vegetative and floral buds in immature involucre. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **34**, 179-183.