

## 한지형 마늘에 있어서 기내뿌리로부터 식물체 재분화

안윤균 · 김도선 · 윤무경

### Plant regeneration from callus derived root of northern type in garlic (*Allium sativum* L.)

Yul Kyun Ahn · Do Sun Kim · Moon Kyoung Yoon

Received: 24 September 2009 / Accepted: 8 October 2009  
© Korean Society for Plant Biotechnology

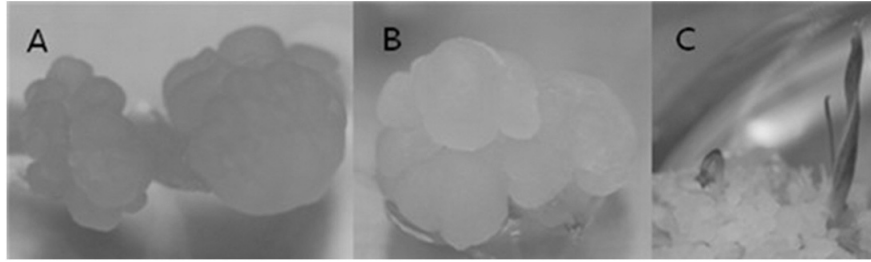
**Abstract** This study was conducted to develop an effective production of callus induction and plant regeneration system for garlic transformation. The best callus production occurred on *in vitro* root segment initially cultured on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L IAA in both ‘Danyang’ and ‘Euseong’. The frequency of callus formation were 81.2% ‘Danyang’ and 76.1% ‘Euseong’. Eight weeks after callus induction, callus lines were transferred to regeneration medium during 7 weeks. The best shoot regeneration medium was MS supplemented with 5 mg/L Kinetin and 1 mg/L NAA for ‘Danyang’ and MS supplemented with 10 mg/L BAP for ‘Euseong’. The frequency of shoot regeneration were 51.5% ‘Danyang’ and 56.6% ‘Euseong’. The plantlets were acclimatized and transferred to the greenhouse with almost survival. This *in vitro* regeneration system should be useful for garlic transformation.

#### 서론

마늘은 세계적으로 조미채소 및 약용으로 이용되는 중요한 작물이다. 전세계적으로 재배되는 마늘은 돌연변이와 선발에 의해 지역종으로 분화되어왔고, 임성있는 마늘은 마늘의 원산지인 중앙아시아에서 발견되었지만, 대부분의 재배종 마늘이 불임으로 교잡에 의한 품종육성이 쉽지 않은 실정이다. 국내에서 재배되는 마늘은 바이러스

에 감염되어 있어서 수량이 급격히 줄어드는 것으로 보고되고 있다 (Chung와 Chang, 1979 Hwang 등, 2004). 영양번식 작물인 마늘재배에서 가장 심각한 문제 중 하나는 바이러스 감염에 인한 퇴화에 따른 생산성 감소이다. 거의 모든 재배종 마늘이 여러종류의 바이러스에 감염되어 있으며 대표적인 바이러스로는 onion yellow dwarf virus (OYDV)와 leek yellow stripe virus (LYSV)가 알려져 있는데 이들 바이러스는 단독 감염 시 20~60%의 수량감소가 있고, 복합 감염시에는 80%까지 수량감소를 가져오는 것으로 보고되고 있다 (Lot 등, 1998). 마늘의 재배에 있어서 문제가 되는 것은 바이러스 이외에도 흑색썩음균핵병, 잎마름병 등이 있고, 충해로는 고자리파리 및 선충 등의 피해가 있다. 이를 극복하기 위한 방법으로는 마늘 형질전환 방법이 하나의 대안이 될 수 있다. 마늘의 형질전환을 위해서는 기내 재분화 체계가 확립되어야 한다. 마늘의 기내 재분화를 위해서는 마늘 식물체 조직으로부터 직접적인 재분화 방법과 캘러스를 이용한 재분화 체계가 확립되어야 하는데, 마늘의 캘러스 형성에 관한 논문은 여러 연구자에 의해 다음과 같이 보고되었다. 잎을 이용한 경우 (Nagasawa and Finer 1988, Wang et al. 1994). 성장점을 이용한 경우 (Kehr and Schaeffer, 1976), 인편의 저반부를 이용한 경우 (Koch et al. 1995, Al-Zahim et al. 1999), 뿌리를 이용한 경우 (Myers and Simon 1998, Barandiaran et al. 1999a, 1999b, Robledo-Paz et al. 2000) 등이 보고되고 있다. Haque 등 (1997)은 마늘의 뿌리 끝부분을 배양하여 높은 기내 재분화율을 보였다. 그러나 이것은 단지 뿌리 끝을 배양하여 획득한 결과이고, 전체적인 뿌리를 이용하여 얻은 결과는 아니다. Ali와 Metwally (1992)는 뿌리조직을 이용하여 배발생 캘러스를 유도하였다. 그러나 이 논문은 하나의 품종을 이용하였고 식물체 재분화율이 매우

Y.-K. Ahn (✉) · D.-S. Kim · M.-K. Yoon  
농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과  
(Vegetable Research Div., National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-440, Korea)  
e-mail: aykyun@rda.go.kr



**Fig. 1** Callus formation and plant regeneration from root segment of garlic. A: Callus formation at edges of an explants. B: Callus cultured on regeneration medium. C: Regenerated shoots from callus for culture 7 weeks

낮아 형질전환을 위한 체계로 활용하기에는 문제가 있으리라 생각된다. 본 연구는 형질전환을 위한 전 단계로 형질전환을 위해 우리나라 한지형 마늘인 ‘단양종’과 ‘의성종’ 마늘을 이용하여 캘러스 형성과 기내 재분화 체계를 확립하기 위해서 수행되었다.

## 재료 및 방법

본 실험에는 재배품종인 ‘단양종’마늘과 ‘의성종’마늘 인편을 70% 에탄올에 30초 소독 후 멸균수로 3회 세척하고 1% sodium hypochlorite로 25분간 소독하고, 멸균수로 3회 세척 후 생장점을 분리하였다. 곧이어 MS배지에 치상하여 4주 후 생장점으로부터 분화된 기내 식물체의 뿌리를 이용한 재분화 실험을 수행하였다. 첫번째 실험으로 기내 식물체 뿌리로부터 캘러스 형성에 적합한 조건을 구명하기 위하여 1 cm의 뿌리를 MS 배지에 치상하였다. 첨가하는 식물생장조정제로는 2,4-D와 IAA조합, 2,4-D와 2ip조합으로 하였고 식물생장조정제 농도는 1 mg/L 2,4-D에서 3 mg/L로 하였고 IAA는 0.1 mg/L에서 0.3 mg/L, 그리고 2ip는 0.05 mg/L에서 1.5 mg/L로 처리하였다. 통계처리를 위해 페트리디쉬 당 20개의 뿌리를 5반복으로 치상한 다음 암상태 25°C로 8주간 배양 후 캘러스 형성율을 조사하였다. 두번째 실험으로 캘러스 형성율이 높았던 1.0 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L IAA 조합에서 유래한 캘러스를 이용하여 MS배지를 기본으로 하고 식물생장조정제로 kinetin, BAP 및 zeatin을 첨가하였다. 농도는 kinetin의 경우 1 mg/L kinetin에서 3 mg/L으로 하였고 5 mg/L kinetin과 1 mg/L NAA 조합, 1 mg/L NAA와 1 mg/L BAP 조합, 10 mg/L BAP, 1 mg/L zeatin 및 2 mg/L zeatin에서 식물체 재분화를 관찰하였다. 통계처리를 위해 페트리디쉬 당 20개의 캘러스를 3반복으로 치상한 다음 25°C로 16시간 일장조건에서 9주간 배양 후 식물체 재분화율을 조사하였다. 캘러스 생성과 식물체 재분화 실험을 위해서 치상한 개체 수는 조금 더 늘어나거나 줄기도 하였다. 배양환경은 25°C, 16시간 일장조건에서 실험하였고 모든 배양배지는 pH 5.8 및 agar 농도는 0.8%였다.

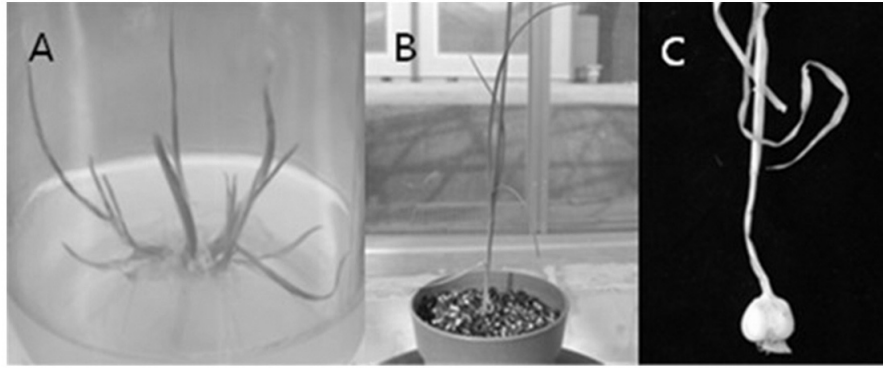
**Table 1** Effect of plant hormone on callus induction from root segment of ‘Danyang’ and ‘Euseong’ after 8 weeks on callus induction medium

Hormone treatments (mg/L)	Callus Induction (%)	
	Danyang	Euseong
2,4-D 1.0 + 2ip 0.05	41.7 e <sup>b</sup>	33.9 f
2,4-D 1.0 + 2ip 0.1	40.6 ef	24.2 g
2,4-D 1.0 + 2ip 1.5	9.8 g	15.3 hi
2,4-D 2.0	40.0 ef	55.1 de
2,4-D 2.0 + 2ip 0.1	32.3 f	17.5 gh
2,4-D 3.0	68.2 bc	48.5 e
2,4-D 3.0 + 2ip 0.1	68.2 bc	38.1 f
2,4-D 1.0 + IAA 0.1	9.0 g	8.9 I
2,4-D 1.0 + IAA 0.2	81.2 a	76.1 b
2,4-D 1.0 + IAA 0.3	56.5 d	62.9 cd
2,4-D 2.0 + IAA 0.1	61.7 cd	64.5 c
2,4-D 2.0 + IAA 0.2	71.7 b	88.5 a
2,4-D 2.0 + IAA 0.3	82.9 a	63.9 c

<sup>b</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multiple range test at  $P=0.05$

## 결과 및 고찰

기내식물체의 뿌리를 이용하여 캘러스 형성에 적합한 배지를 선발하고자 우리나라의 대표적인 한지형 마늘 품종인 ‘단양종’과 ‘의성종’마늘을 이용하였다. 캘러스 형성에 적합한 배지를 선발하고자 2, 4-D와 2ip 5조합, 2,4-D와 IAA 6조합 및 2,4-D 2조합으로 실험한 결과 캘러스는 자른 뿌리 끝부분에서 형성되었다 (Fig. 1. A). 2, 4-D와 2ip 조합에서 ‘단양종’ 마늘의 캘러스 형성율은 9.8%에서 41.7%였고 ‘의성종’ 마늘은 15.3%에서 55.1%였다 (Table 1). 2,4-D 단독으로 배양 하였을 경우 2 mg/L 2,4-D에서 ‘단양종’마늘은 캘러스 형성율이 40%였고, ‘의성종’ 마늘은 55.1%였고 2 mg/L 2,4-D에서 ‘단양종’마늘은 캘러스 형성율이 68.2%였고, ‘의성종’ 마늘은 48.5%였다. 높은 2,4-D 농도(3mg/L)에서 2,4-D만 처리하거나 2ip를 혼용하였을 경우 ‘단양종’ 마늘의 캘러스 형성율이 높았다. 2,4-D와 IAA조합에서 캘러스 형성율은 ‘단양종’ 마늘의 캘러스 형성율은 9%에서 82.9%였고 의성종 마늘은 8.9%에서 88.5%였다. 2,4-D와 IAA조합이 2, 4-D단독이나 2,



**Fig. 2** Plantlet regeneration from garlic callus. A: Multiple shoot proliferated after 30days of transfer on MS medium, B: Plantlet in pot during acclimation, C: Production of Garlic bulb from Plantlet regeneration

**Table 2** Effect of plant hormone treatments on shoot regeneration from callus of ‘Danyang’ and ‘Euseong’ after 7 weeks culture on medium

Hormone treatments (mg/L)	Shoot regeneration (%)	
	Danyang	Euseong
Kinetin 1	0.0 d <sup>b</sup>	0.0 c
2	0.0 d	3.0 c
3	0.0 d	0.0 c
Kinetin 5 + NAA 1	51.5 a	50.0 ab
NAA 1 + BAP 1	23.0 c	41.1 b
BAP 10	31.9 b	55.6 a
Zeatin 1	0.0 d	0.0 c
2	0.0 d	0.0 c

<sup>b</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multiple range test at *P*=0.05

4-D와 2ip 조합보다 높은 캘러스 형성을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 캘러스 형성이 가장 좋은 조합은 ‘단양종’마늘의 경우 2.0 mg/L 2,4-D 와 0.3 mg/L IAA 조합에서 82.9%였고 ‘의성종’ 마늘의 경우 2.0 mg/L 2,4-D 와 0.2 mg/L IAA 조합에서 88.5%로 가장 높았다. 본 실험의 결과에서 보여주지는 못하였지만 2,4-D와 IAA 농도가 높을 경우 식물체 재분화율이 떨어지고 변이체 발생율이 높을 것으로 판단되어 마늘의 캘러스 형성을 위한 적정 식물생장조정 농도는 1.0 mg/L 2,4-D 와 0.2 mg/L IAA 로 하였다. 1.0 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L IAA 조합에서 캘러스 형성율은 ‘단양종’마늘은 81.2%였고 ‘의성종’마늘은 76.1%로 높은 캘러스 형성율을 보였다 (Table 1).

마늘의 캘러스로부터 식물체 재분화를 위해 캘러스 유도 배지에서 8주된 캘러스를 식물체 재분화 배지에 치상하였다 (Fig. 2. B). 식물체 재분화를 위한 식물생장조정제 종류 및 농도는 kinetin 3농도, kinetin과 NAA조합, NAA와 BAP 조합, 10 mg/L BAP, 1 mg/L zeatin 및 2 mg/L zeatin에서 식물체 재분화를 관찰하였다. 식물체 재분화는 재분화 배지에 캘러스를 치상한지 7주째 식물체 재분화를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1. C). Table 2에서 보는 바와 같이 ‘단

양종’ 마늘의 경우 kinetin 단용처리의 경우 어느 농도에서도 식물체 재분화를 관찰할 수 없었으며, ‘의성종’ 마늘의 경우 2 mg/L kinetin에서 3%의 식물체 재분화율을 보였으나, 1 mg/L kinetin와 3 mg/L kinetin에서 식물체 재분화를 관찰 할 수 없었다. 1 mg/L NAA와 1 mg/L BAP에서 식물체 재분화율은 ‘단양종’ 마늘의 경우는 23%였고 ‘의성종’ 마늘의 경우는 41.1%였다. 10 mg/L BAP의 경우 ‘의성종’ 마늘에서 55.6%의 재분화율을 보였고 ‘단양종’의 경우 31.9%의 기내 재분화율을 보였다. 이 같은 결과는 품종에 따라 기내 재분화율에 적절한 성장조정제가 다르다는 보고와 일치하는 것으로 품종에 따른 재분화 체계를 확립할 필요가 있음을 알 수 있었다 (Myers and Simon, 1998). 캘러스로부터 식물체 재분화 형태인 기관 발생은 파속 작물에 있어서 보고되었고 (Novak et al., 1990) 마늘에 있어서도 보고되고 있으며 (Kehr and Schaeffer, 1976, Wang et al 1994), 본 실험의 경우도 재분화 형태는 기관발생 형태였다. 5 mg/L kinetin과 1 mg/L NAA 첨가의 경우 ‘단양종’의 경우 51.5% 그리고 ‘의성종’의 경우 50.0%의 식물체 재분화율을 보였다. 식물체 재분화에 가장 효과적인 식물생장조정제 농도는 ‘단양종’ 마늘은 5 mg/L kinetin과 1 mg/L NAA 그리고 ‘의성종’ 마늘의 경우는 10 mg/L BAP였다. 재분화된 식물체는 MS 배지로 옮겨서 4주간 배양 후 화분으로 옮겨서 순화 처리 후 하우스에서 재배하였는데 정상적인 생육을 보였으며, 정상적인 구를 생산하였다 (Fig. 2. A.B.C).

**적 요**

본 연구는 마늘의 형질전환 체계를 확립하기 위해 캘러스 형성과 식물체 재분화에 효과적인 방법을 개발하고자 수행되었다. 가장 적합한 캘러스 형성 배지는 ‘단양종’과 의성종 마늘 모두 1.0 mg/L 2,4-D 와 0.2 mg/L IAA 였다. 캘러스 형성율은 ‘단양종’ 마늘은 81.2% 였고 의성

종 마늘은 76.1%였다. 캘러스 형성을 유도한지 8주 후 형성된 캘러스를 재분화 배지에서 7주 동안 배양하였다. 가장 적합한 식물체 재분화 배지는 '단양종' 마늘의 경우 5 mg/L kinetin와 1 mg/L NAA 였고 '의성종' 마늘의 경우는 10 mg/L BAP였다. 재분화된 식물체는 하우스에 이식하였는데, 거의 모두가 생존하였다. 기내뿌리를 이용한 식물체 재분화 체계는 마늘 형질전환을 위해 유용하게 이용 될 것이다.

## 인용문헌

- Al Zahim MA, Ford Lloyd BV, Newbury HJ(1999) Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep* 18:473-477
- Ali A, Metwally EE (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration as a tool for garlic improvement. *Egypt J Appl Sci* 7: 727-735
- Barandiaran X, Martin N, Rodriguez Conde M, Di Pietro A, Martin J (1999a) Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 18:434-437
- Barandiaran X, Martin N, Rodriguez Conde M, Di Pietro A, Martin J (1999b) An efficient method for callus culture and shoot regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *HortScience* 34:348-349
- Chung HD, Chang MU (1979) Studies on infection of virus in garlic in Korea. *J Kor Soc Hort Sci* 20(2):123-129
- Haque MS, Wada T, Hattori K (1997) High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 50:83-89
- Hwang JM, Kim JI, Oh SM, Uhm JS, Ha HT (2004) Field test of virus free seed garlic derived from tissue culture. *J Kor Soc Hort Sci Technol* 22(4):411-415
- Kehr AE, Schaeffer GW (1976) Tissue culture and differentiation of garlic. *HortSci* 11:422-423
- Koch M, Tanami Z & Salomon R (1995) Improved regeneration of shoots from garlic callus. *HortScience* 30:378
- Lot H, Delecolle B, Bocardo G, Mazachi C, Milne R. (1994) Partial characterization of retrovirus-like particles associated with garlic dwarf disease. *Plant Pathol* 43:537-546
- Myers JM, Simon PW (1998) Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. *Plant Cell Rep* 17:726-730
- Nagasawa A, Finer JJ (1988) Induction of morphogenic callus cultures from leaf tissue of garlic. *HortScience* 23:1068-1070
- Novak FJ (1990) *Allium* tissue culture. In: Rabinowitch HD&Bre-wster JL (eds) *Onions and Allied Crops*, Vol. 1 (pp 233-250). CRC, Boca Raton, Florida
- Robledo PA, Villalobos Arambula VM, Jofre Garfias AE (2000) Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root tip culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:416-419.
- Wang HL, Kang YQ, Zhang CJ (1994) Embryogenesis via culture of garlic sprout leaf. *Acta Agric Boreali Sin.* 9:92-94