

마늘의 경정배양에서 기내인경구 대량생산을 위한 2단계 배양의 도입

황혜연, 이영복*

충남대학교 농업생명과학대학 원예학과

Introduction of two-step culture method for multiple seed bulb development from shoot tip culture of garlic (*Allium sativum* L.)

Hye-Yeon Hwang and Young-Bok Lee*

Department of Horticulure, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT In vitro culture of shoot tip of garlic (*Allium sativum* L. cv. Seosan) was carried out to find medium condition of the induction of multiple shoots and bulbing for muliproduction of virus-free seed bulbs. For this work, tank culture was introduced. In shoot tip culture on MS solid medium the induction of multiple shoots and bulbing were better by adding 3% sucrose than 8%. Supplementation with 2 mg/L 2ip and 0.2 mg/L IAA in this medium was effective. Three point three shoots including 2.7 bulbs were formed from a shoot tip after cultivation for 30 days on this medium. Bulbing of garlic in liquid culture with plastic water tank of 20 L supplied air at the side of the lower part was better by adding 3% sucrose than 8% by subculture for 45 days with shoots obtained from shoot tip culture for 30 days on soid MS medium. Shoot growth was vigorous at 3% sucrose however bulb growth was more effective on the medium of 8% sucrose. Because of the effectiveness on solid medium added 3% sucrose, 2 mg/L 2ip and 0.2 mg/L IAA for initial production of multi-shoot in stem tip culture and the effectiveness in liquid culture with water tank for growth of bulbs, the method of two-step culture could be introduced for the multiple production of seed bulb of high quality. It was more desirable by supply of 0.2 mg/L BA and 0.02 mg/L NAA at tank culture time. But growth of the bulbs became poor by increasing concentration of NAA of the medium.

서 론

영양변식성 작물인 마늘은 재배과정에서 자식성 종구의 연작으로 바이러스나 다른 병원균에 의해 감염될 확률이 높고 이로 인한 수량의 감소가 현저한 것은 많은 연구의 결과에서 밝혀졌다 (Ayuso and Pena-Iglesias 1981, Bos 1982, Walkey and Antill 1989). 이의 해결을 위해서는 무병종구의 생산이 필요하며 무병종구의 생산은 생장점배양이 가장 유효한 방법으로 제시되어 왔지만 생장점배양만으로는 바이

러스 퇴치에 기술적으로 다소의 문제가 제기되고 있기 때문에 무병주생산의 효율성을 높이기 위하여 생장점을 절취하기 전에 재료의 열처리를 겸행하는 방법이 도입되기도 하였다 (Walkey et al. 1987, Moriconi et al., 1990, Conci and Nome 1991, Nagakubo et al. 1993, Verbeek et al. 1995).

마늘의 생장점배양에서는 일반적으로 1개의 생장점으로부터 1개의 유식물체가 발생한다. 따라서 증식의 효율성이 매우 저조한 편이다. 이러한 결점을 극복하고 대량증식을 도모하기 위하여 마늘 인편의 기저판배양 (stem-disc culture) 으로 미분화상태인 다수의 액아가 분화되도록 유도하거나 (Bhojwani 1980, Ravnkar et al. 1993, Seabrook 1993, Ayabe

*Corresponding author Tel 042-821-5736 Fax 042-823-1382
E-mail: yblee@cnu.ac.kr

M and Sumi 1998), 근단조직배양이나 (Haque et al. 1997, Myers and Simon 1998, Barandiaran et al. 1999a; 1999b, Robledo-Paz et al. 2000, Martn-Urdroz et al. 2004), callus배양을 이용하여 대량의 신초분화를 유기시키는 방법 등이 도입되기도 하였다 (Ayabe M and Sumi 1998, Martn-Urdroz et al. 2004). 또한 Ayabe 등 (1995)은 성장점배양에서 발생한 원기로부터 얻어진 작은 callus를 이용한 원형질체 배양을 통하여 다량의 유식물체를 획득하는 방법을 시도하기도 하였다.

이 중 기저관배양의 경우 무병모주를 재료로 사용해야 하는 어려움이 있고, callus배양에서는 변이성의 유발에 대한 우려가 있기 때문에 가장 안전한 방법은 성장점배양을 통한 대량증식체계를 확립하는 것이다. 성장점을 기내에서 배양하여 대량의 기내종구를 생산하기 위해서는 다신초의 유기 및 기내구의 비대조건을 찾아야 한다. 본 연구에서는 이러한 조건을 찾고자 배지내의 성장조절물질을 첨가하여 신초의 대량발생 여부를 구명하고자 하였으며, 생물반응기 등 대형배양용기를 이용하여 대량생산을 위한 다신초의 분화와 기내구의 발달에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

Sucrose 농도와 성장조절물질 처리에 따른 shoot와 bulb 형성의 비교

4°C 저온고에서 40일간 저장하였던 마늘 (*Allium sativum* L. cv. Seosan)을 재료로 공시하였다. 마늘의 경정을 채취하기 위해 뿌리부분을 깨끗하게 제거한 후 70% ethyl alcohol에 30초 동안 표면 살균하고, 멸균수로 3회 세척하였다. 이어서 20% NaOCl 용액으로 15분간 소독한 다음 멸균수로 3회 세척하였다.

마늘의 엽원기 1매를 포함한 경정부위를 무균상태로 절취하여 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 치상한 후 배양하였다. 배양용기는 500 mL 배양용기를 사용하였으며 용기당 2개의 경정부위를 치상하여 20반복 처리하였다. 배지의 sucrose 농도는 3%와 8%의 2처리로 하고 배양조건은 25°C, 16시간 일장으로 하였다. 경정을 치상하여 30일간 배양한 후에 shoot의 분화와 bulb 형성을 조사하였다. 아울러 성장조절물질에 따른 신초 발생정도를 알아보기 위해 마늘의 경정부위를 채취하여 성장조절물질이 첨가된 배지에 치상하였다. Sucrose 3%가 첨가된 MS 기본 배지에 cytokinin류의 kinetin과 6- $\gamma\gamma$ -dimethylallylaminopurine (2iP)의 농도를 1, 2,

4 mg/L로 하고 각각에 IAA 또는 NAA를 0.2 mg/L 첨가하였다. 성장조절물질 무첨가 처리구를 대조구로 하였다. 배양은 25°C, 16시간의 장일조건으로 하였으며 배양 30일 후에 shoot와 bulb의 수를 조사하였다.

Tank배양을 이용한 기내구 형성 및 비대유도

경정으로부터 분화된 multiple-shoot와 bulb를 tank배양으로 대량생산하기 위한 활용방안으로 20 L 시판용 투명한 플라스틱 생수통 (water tank)을 이용하였다. 배양시 저면으로부터 소형 펌프를 이용하여 공기를 투입하였으며 상부의 주입구에서 배기가 되도록 하였고, 주입구나 배기부에 0.02 μ m 필터를 부착하여 오염으로부터 방지하였다. 본 실험의 재료로는 sucrose의 농도를 3%로 하고 2.0 mg/L 2iP와 0.2 mg/L IAA를 첨가한 MS고체배지에 경정을 치상한 후 2개월간 배양하여 다신초를 분화시키고 이 들 다신초를 분할하여 사용하였다. Tank 액체배양시 배지의 sucrose 농도를 3%와 8%로 설정하여 기내구의 형성과 비대에 당의 급원으로서 sucrose 농도가 bulb의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 이 때의 배지양은 5 L로 하였다. 처리당 30개체의 shoot를 배지에 옮기고 25°C, 16시간 일장으로 배양하였고, 광의 효율을 높이기 위해 바닥에 알루미늄 호일을 깔고 배양하였다. 45일간 배양한 후에 bulb의 직경, 무게 등 생육상태를 조사하였다.

Tank배양시 BA와 NAA의 효과를 알아보기 위해 40일간 저온처리한 마늘의 경정을 3% sucrose의 MS고체배지에 치상한 후 25°C, 16시간의 일장으로 30일 동안 배양한 후, 8% sucrose가 첨가된 액체배지에 옮겨 상기와 동일한 방법으로 tank 배양을 실시하였다. 구비대를 위한 성장조절물질로는 0.2 mg/L BA + 0.02 mg/L NAA, 0.2 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA, 0.2 mg/L BA + 2 mg/L NAA의 처리구를 설정하였으며, 성장조절물질이 첨가되지 않는 기본 MS액체배지를 대조구로 하였다. 탱크의 배지양은 5L로 하였고 배양 조건은 25°C, 16시간 일장으로 하였으며 60일 후에 생육과 구비대 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

Sucrose 농도와 성장조절물질 처리에 따른 shoot와 bulb 형성의 비교

마늘의 경정배양에서 MS고체배지의 sucrose 농도를 3%와 8%로 설정하여 경정을 치상하여 30일간 배양한 후의

shoot의 분화와 bulb형성을 조사하였다.

본 실험에서의 sucrose 농도에 의한 차이는 30일간의 배양 초기단계에서의 결과로서 Figure 1에서와 같이 경정배양에서의 shoot 발생이나 기내구 형성 모두 3% sucrose 첨가배지에서 8% 첨가배지보다 양호하여 3%의 sucrose농도에서 shoot는 1.9개 발생하였고, bulb는 0.9개 형성되었다. 반면 8%의 sucrose농도에서는 shoot 발생은 1.0에 bulb의 형성은 0.3으로 많은 차이를 보이고 있었다. 경정배양에서 당은 식물체의 전분축적을 위한 중요한 탄수화물의 급원이기 때문에 shoot형성과 bulb의 비대에 필수적인 요소라 할 수 있으므로 특히 기내구의 형성과 비대에 당의 급원으로서 sucrose의 농도에 따른 효과에 차이가 있을 것으로 본다. 따라서 마늘의 경정배양에서 저농도의 sucrose가 shoot의 발생이나 bulb의 형성을 촉진시킴을 알 수 있었으며, 이는 경정을 배지에 치상한 후 경정의 초기생장과정에서의 배지의 삼투압차에 의한 것으로 간주할 수도 있으나 기내구의 형성과정 다음 단계인 비대과정에서의 효과도 더 검토할 필요가 있다.

Cytokinin류의 kinetin과 2iP에 각각 auxin류의 IAA 또는 NAA를 0.2 mg/L의 농도로 처리한 고체배지에 마늘의 경정을 치상하여 30일간 배양한 결과, kinetin처리구에서는 4 mg/L kinetin과 0.2 mg/L NAA (Figure 2, K3)가 첨가된 배지에서 shoot 발생수가 2.9개로 양호하게 나타났지만 bulb의 수가 0.9개로 현저히 저조하게 나왔다. 두 종류의 cytokinin 처리에서 2 mg/L 2iP와 0.2 mg/L IAA의 혼합배지에서 shoot 발생과 bulb의 수가 가장 양호하였으며 이 처리구에서 발생한 shoot와 bulb의 수는 각각 3.3 및 2.7개로 나타났다 (Fig. 2, P5). 아울러 2iP 4 mg/L와 IAA 0.2 mg/L가 첨가된 배지에서도 다른 배지에 비해 양호한 shoot와 bulb가 발생하였다. Kinetin 처리구와 2iP처리구간의 다신초의 발생 정도는 뚜렷

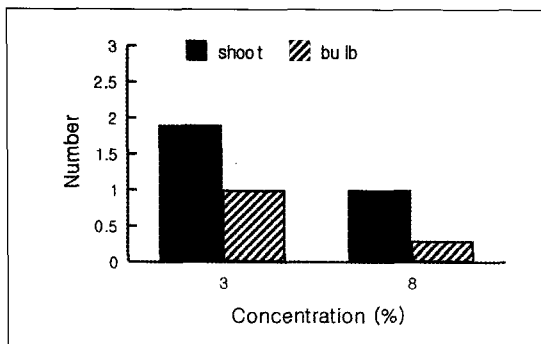


Figure 1. Shoot formation and bulb development after cultivation of shoot tip for 30 days on MS solid medium supplemented with 3% and 8% sucrose.

하게 구분하기는 어려웠지만 Figure 3에서와 같이 kinetin처리구 보다 2iP처리구에서의 신초발생주의 상태가 양호하였음이 확인되었다. Robert 등 (1998)도 BA와 IAA가 첨가된 배지에서 초기배양을 한 후 2iP와 jasmonic acid를 첨가한 배

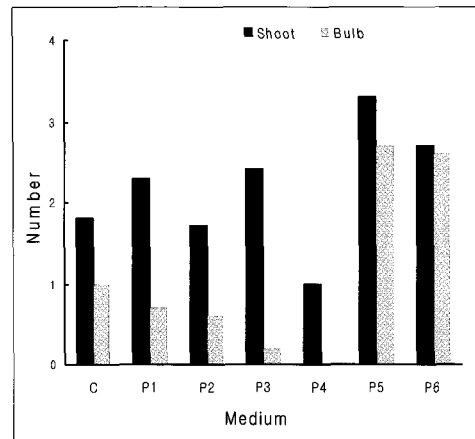
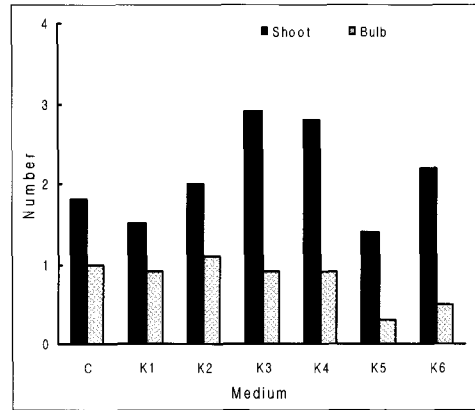


Figure 2. Shoot formation (upper) and bulb development (lower) on MS solid medium supplemented with kinetin or 2iP as cytokinin and NAA or IAA as auxin. C: control, K: kinetin, P: 2iP, 1: 1 mg/L cytokinin + 0.2 mg/L NAA, 2: 2 mg/L cytokinin + 0.2 mg/L NAA, 3: 4 mg/L cytokinin + 0.2 mg/L NAA, 4: 1 mg/L cytokinin + 0.2 mg/L IAA, 5: 2 mg/L cytokinin + 0.2 mg/L IAA, 6: 4 mg/L cytokinin + 0.2 mg/L IAA



Figure 3. Comparison of the multi-shoot developed on the MS medium containing kinetin (left) and 2iP (right).

지에서 계대배양을 한 후 평균 6-7개의 shoot를 발생시켰으며, Bhojwani (1980)는 2iP와 NAA를 포함한 B5배지에서 6주마다 8배의 증식효과를 보았다고 하여 2iP의 효과를 인정하였으나, Lee와 Lee (1994)는 2 mg/L kinetin과 0.5 mg/L NAA 첨가된 MS배지에서 4개월만에 한 개의 경정배양에서 2개의 shoot만을 분화시킬 수 있었다고 하였다. 경정을 배양하면서 배지의 조건을 합리적으로 조절함으로써 다수의 신초발생을 유도할 수 있기 때문에 이러한 다신초의 발달은 소인경구의 형성율을 높여줄 것으로 간주된다.

Tank배양을 이용한 기내구 형성 및 비대유도

기내구의 비대과정에서의 효과에 있어서 당은 식물체의 전분축적을 위한 중요한 탄수화물 급원이기 때문에 bulb의 비대에 필수적인 요소라 할 수 있으므로 특히 비대과정인 tank액체배양에서도 기내구의 형성과 비대에 당의 급원으로서 sucrose 농도에 따른 효과를 비교하였다.

다신초를 유도할 수 있는 조건의 배지에서 경정을 2개월 동안 배양하여 다신초를 유도한 후, shoot를 분리하여 인경구로 비대시키기 위한 조건으로 배양하였다. 20 L tank를 이용하여 sucrose 농도를 3%와 8%로 설정한 MS액체배지에 옮겨 45일간 계대배양한 후에 bulb형성을 조사하였다. Figure 4

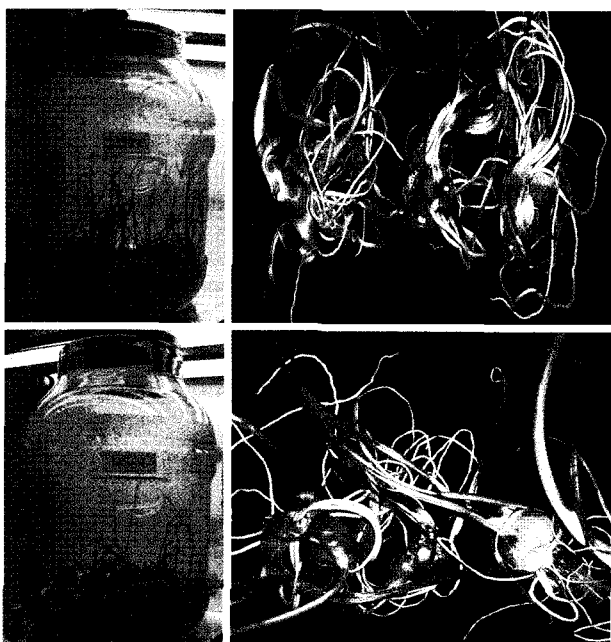


Figure 4. Growth of bulb of garlic at concentration of 3% (upper) and 8% (lower) of sucrose in water tank culture for subculture of 45 days following shoot tip culture on solid medium for 2 months.

에서와 같이 경정배양에서의 유식물체의 생육에 있어서는 3% sucrose 첨가조건에서 8% 첨가배지보다 양호하였다. 그러나 기내구 형성에 있어서는 Figure 5에서와 같이 bulb의 형성수는 sucrose의 농도가 8%일 때 보다 효과적임을 알 수 있었다. 또한 bulb의 직경이나 생체중, 풍건시킨 후의 직경과 생체중에 있어서는 Figure 6에서와 같이 8%의 sucrose조건에서 양호한 경향을 보였다. Nagakubo 등 (1993)도 한지형과 난지형 마늘을 재료로 다양한 실험에서 마늘의 구비대에는 성장조절물질이 첨가되지 않고 sucrose의 농도가 6-12%일 때 매우 양호하다고 보고하고 있다. 그러나 전단계의 실

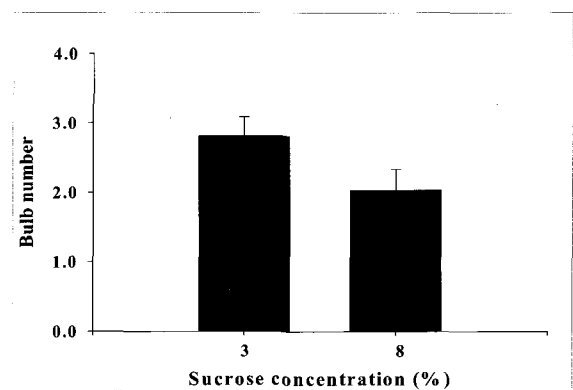


Figure 5. Bulb development in water tank culture for 45 days following cultivation for 2 month on MS solid medium.

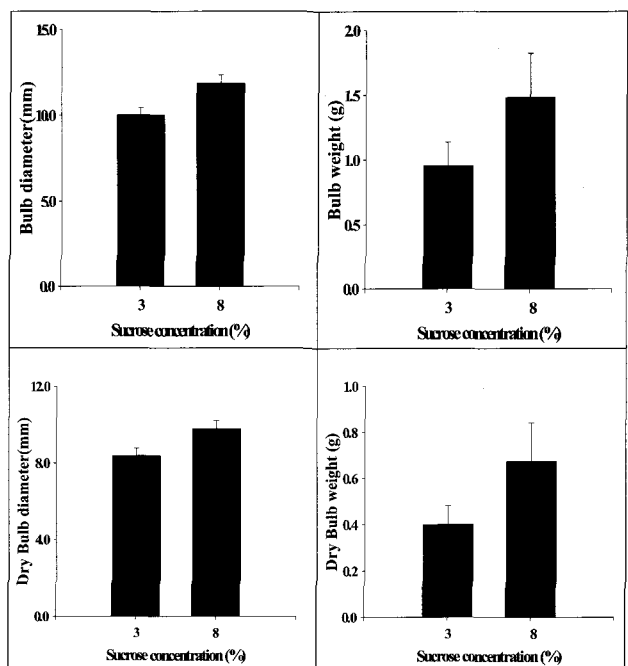


Figure 6. Diameter and weight of fresh bulb and air-dried bulb developed in water tank culture for 45 days following cultivation for 2 month on MS solid medium.

험결과인 Figure 1에서와 같이 다신초의 생산에는 3% sucrose 조건에서 양호한 효과를 보이고 있으므로 마늘의 인경구를 대량으로 생산하기 위해서는 다신초의 생산과 구형성 및 비대를 구분하여 배양하는 2단계 배양법 (two-step culture method) 을 도입하는 것이 유리할 것으로 확인되었다.

40일간 저온처리한 마늘의 경정을 3% sucrose의 MS고체 배지에 치상하여 25°C, 16시간의 일장으로 30일 동안 배양한 후, 8% sucrose가 첨가된 액체배지에 옮겨 상기와 동일한 방법으로 tank배양을 하였다. 이 때 배지의 BA농도를 0.2 mg/L로 하고 NAA의 농도를 0.02, 0.2 및 2 mg/L로 처리한 배지의 tank에서 60일 동안의 배양한 후의 생육은 Table 1에서와 같이 0.2 mg/L BA와 0.02 mg/L NAA가 첨가된 처리구에서 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 이 때의 전체적인 생육상태를 검토한 결과는 Figure 7-1과 같았다. 신초의 생육은 대조구 (Figure 7-1 A)에서 양호한 것으로 보였으나, 실제적으로 생체중, 근중 및 인경구의 생체중에 있어서는 0.2 mg/L BA와 0.02 mg/L NAA가 첨가된 처리구가 보다 양호한 것으로 확인되었다. Tank내에서 shoot의 성장과 bulb의 비대에 성장 조절물질의 영향이 많이 미친다는 것을 알 수 있었으며, NAA는 농도가 높을 수록 신초나 bulb의 생육이 현저하게 저하됨을 볼 수 있었다 (Figure 7-2). 수확 후 풍건하였을 때의 상태에서도 NAA농도가 높을 수록 구의 상태가 양호하지 않아 우량한 종구의 생산에서는 NAA의 농도를 낮추는 것이 바람직한 것으로 확인되었다 (Figure 7-2 D).

적 요

마늘의 경정을 기내배양하여 대량의 기내종구를 생산하기 위한 다신초의 유기 및 기내구의 비대조건을 찾고자 배지의 당의 농도를 다르게 하고 또한 성장조절물질을 첨가하여 신초의 대량발생 여부를 확인하였으며, 대형배양용기를

Table 1. Shoot growth and bulb development in water tank culture for 45 days following cultivation for 2 month on MS solid medium

Treatment		Shoot wt (mg)	Root wt (mg)	Bulb	
BA	NAA			diam (mm)	fresh wt (mg)
0	0	674	66	7.7	489
0.2	0.02	962	95	6.5	546
0.2	0.2	401	23	5.0	256
0.2	2	380	-	3.3	216

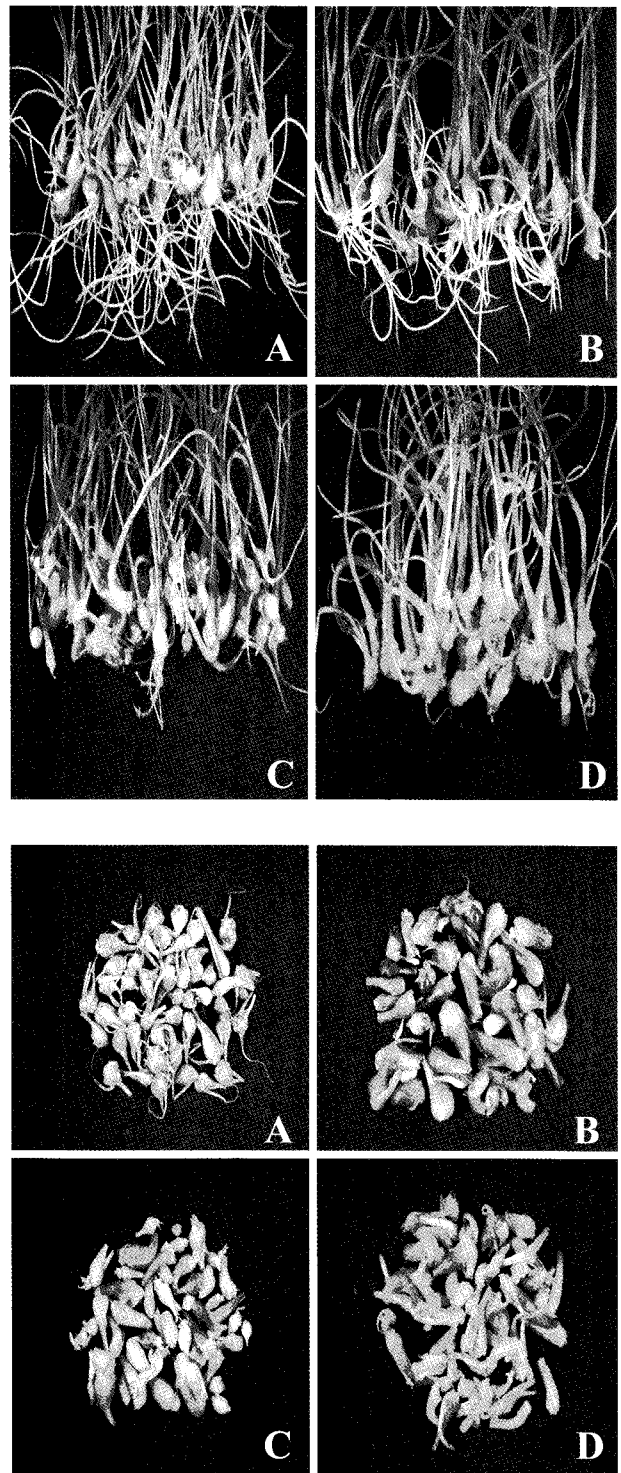


Figure 7-1 (upper). Comparison of the shoots and bulbs developed in water tank culture for 45 days in the MS medium containing BA and NAA following cultivation for 2 month on MS solid medium.

Figure 7-2 (lower). Air-dried bulbs. A, Control; B, 0.2 mg/L BA + 0.02 mg/L NAA; C, 0.2 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA; D, 0.2 mg/L BA + 2 mg/L NAA.

이용하여 대량생산을 하기 위한 tank배양에서 신초의 분화와 기내구의 발달에 관하여 검토하였다.

경정배양에서의 shoot 발생이나 기내구 형성 모두 3% sucrose 첨가 MS고체배지에서 8% 보다 양호하였으며, 성장조절물질의 효과는 2 mg/L 2iP와 0.2 mg/L IAA의 혼합처리에서 shoot 발생과 bulb의 형성수가 양호하였다. 이 처리구에서 발생한 shoot와 bulb의 수는 각각 3.3 및 2.7개로 나타났다.

다신초를 유도할 수 있는 조건의 배지에서 경정을 2개월 동안 배양하여 다신초를 분화시킨 후, 20 L water tank를 이용하여 sucrose 농도를 3%와 8%로 설정한 MS액체배지에 옮겨 45일간 배양한 후에 bulb형성을 조사하였을 때 유식물체의 생육에 있어서는 3% sucrose 첨가조건에서 8% 첨가배지보다 양호하였다. 그러나 기내구의 형성이나 생장에 있어서는 sucrose의 농도가 8%일 때 보다 효과적이었다. 경정배양에서의 다신초의 초기생산에는 3% sucrose조건에서 양호한 효과를 보이고 있으므로 마늘의 인경구를 대량으로 생산하기 위해서는 다신초의 생산과 구비대 과정을 구분하는 2단계 배양법을 도입하는 것이 유리할 것이다.

Tank배양시 배지에 0.2 mg/L BA, 0.02 mg/L NAA를 첨가한 처리에서 양호하였으며 NAA 농도가 높을 수록 유식물체의 생육이나 구비대의 효과는 현저하게 저하되었다.

인용문헌

- Ayabe M, Taniguchi K, Sumi S (1995) Regeneration of whole plants from protoplasts isolated from tissue-cultured shoot primordia of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 15:17-21
- Ayabe M, Sumi S (1998) Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 17: 773-779
- Ayuso P, Pena-Iglesias A (1981) The elimination of garlic viruses by thermotherapy and/or tissue culture. *Cell Biol Int Rep* 9: 835-836
- Barandiaran X, Martn N, Rodriguez-Conde MF, Di Pietro A, Martn J (1999a) Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 18: 434-437
- Barandiaran X, Martn N, Rodriguez-Conde MF, Di Pietro A, Martn J (1999b) An efficient method for callus culture and shoot regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *HortScience* 34: 348-349
- Bhojwani SS (1980) In vitro propagation of garlic by shoot proliferation. *Sci Hort* 13: 47-52
- Bos L (1982) Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta Hort* 127: 11-29
- Conci VC, Nome SF (1991) Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *J Phytopathol* 132: 186-192
- Haque MS, Wada T, Hattori K (1997) High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. *Plant Cell Tissue Organ Cul* 50: 83-89
- Lee EM, Lee YB (1994) Systematic propagation of high quality garlic (*Allium sativum* L.) through shoot apical meristem culture. II. Effect of sucrose concentration and nitrogen source on in vitro formation of bulblets. *Kor J Plant Tissue Cult* 21: 193-199
- Martn-Urdroz N, Garrido-Gala J, Martn J, Barandiaran X (2004) Effect of light on the organogenic ability of garlic roots using a one-step in vitro system. *Plant Cell Rep* 22: 721-724
- Moriconi DN, Conci VC, Nome SF (1990) Rapid multiplication of garlic *Allium sativum* L. in vitro. *Fiton* 51: 145-151
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-97
- 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
- Nagakubo T, Nagasawa A, Ohkawa H (1993) Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 32: 175-183
- Ravnikar M, Žel J, Plaper I, Špacapan A (1993) Jasmonic acid stimulates shoot and bulb formation of garlic in vitro. *J. Plant Growth Regul* 12, pp. 73-77
- Robert U, Žel J, Ravnikar M (1998) Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. *Sci Hort* 73: 193-202
- Robledo-Paz A, Villalobos-Armbula VM, Jofre-Garfias AE (2000) Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. *In Vitro Cell Dev Plant* 36: 416-419
- Seabrook JEA (1993) In vitro propagation and bulb formation of garlic. *Can J Plant Sci* 74: 155-158
- Verbeek M, Van Dijk P, Van Well PMA (1995) Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. *Eur J Plant Pathol* 101: 231-239
- Walkey DGA, Webb MJW, Bolland CJ, Miller A (1987) Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *J Hort Sci* 62: 211-220
- Walkey DGA, Antill DN (1989) Agronomic evaluation of virus-infected garlic (*Allium sativum* L.). *J Hort Sci* 64: 53-60

(접수일자 2008년 2월 6일, 수리일자 2008년 3월 6일)