

조직배양을 이용한 산마늘 재분화 및 대량 생산체계 확립

김원배 · 김정기 · 이은애 · 김병현 · 김정간 · 임학태 *

(농촌진흥청 고령지 농업시험장, *강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부)

Establishment of Plant regeneration and micropropagation of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* Makino via tissue culture

Kim, Won-Bae · Kim, Jeong-Gi · Lee, Eun-Ae · Kim, Byeong-Hyeon ·

Kim, Jeong-Kan · Lim, Hak-Tae *

Alpine Agricultural Experiment Station, RDA, Pyonchang, Kangwon-do
232-950; and 1Division of Applied Plant Science, College of Agriculture and Life
Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701. * Corresponding author

적 요

본 연구를 통해 기관분화 및 체세포배발생과정을 이용한 산마늘(*A. victorialis* var. *platyphyllum*)의 재분화 및 대량생산 체계가 확립되었다. 인경조직을 0.2 mg/L NAA와 2.0 mg/L zeatin이 첨가된 배지에 치상하였을 때 신초가 배양절편체로부터 직접 유도되었다. 인경조직을 0.2 mg/L NAA, 0.2 mg/L BAP 그리고 1.0 mg/L picloram이 첨가된 배지에 배양하였을 때, 4-5 주 후 배발생캘러스를 얻을 수 있었다. 배발생캘러스는 신초유도용 배지(0.2 mg/L NAA와 2.0 mg/L zeatin)에 계대배양시 여러개의 체세포배를 형성하였으며 지속적인 배양을 통해 이들 체세포배들은 신초로 분화되었다. 이러한 식물체 재분화 방법은 유용한 유전자를 도입해서 형질전환체계에 유용하게 이용될 것이다. 여러지역에서 수집된 산마늘 계통 (지리산, 오대산, 울릉도, 운두령) 간의 기내 대량번식능력을 시험해 본 결과 지리산에서 자생하는 산마늘의 한 개의 경단배양에서 최고 98개의 신초를 얻을 수 있었다. 재분화된 신초는 1.0 mg/L NAA가 첨가된 MS 배지에 옮겨 보다 굵은 뿌리를 유도한 후 인공토양에 옮겨 활착시켰다.

I. 서 론

산마늘은 지리적으로 시베리아, 중국, 한국, 일본 등에 분포하는 백합과의 다년생식물로 우리나라에서는 오대산, 지

리산, 설악산 등의 고산지나 울릉도의 숲속 또는 북부지방에 자생하고 있다. 또한 독특한 맛과 향미 그리고 풍부한 무기성분, 비타민 등을 지니고 있어 봄철 연한 잎과 줄기를 생채로 이용하거나 무침, 절임, 튀김, 김치 및 염장가공 등으로 다양하게 조리하여 이용되는 고급산채로서 근래 수요가 증

Table 1. Effect of plant growth regulators on shoot induction from shoot tip, bulb, and leaf disk of *A. victoralis* after 2 months of culture.

Plant growth regulators (mg/L)				Shoot induction ^a		
NAA	BAP	Kinetin	Zeatin	Shoot tip	Bulb	Leaf disk
0.2	1.0	0	0	+	++	-
0.2	2.0	0	0	++	++	-
0.2	0	1.0	0	+	+	-
0.2	0	2.0	0	+	+	-
0.2	0	0	1.0	+	++	-
0.2	0	0	2.0	++	+++	-

^a -, none; +, less than 30%; ++, 30-70%; +++, more than 70%.

가일로에 있으며 최근에는 인체내의 비타민 B의 흡수를 촉진하는 메카니즘과 항혈전 작용물질의 존재가 밝혀짐에 따라 기능성 식품 및 생약제로서도 주목되고 있다(Choi, 1991). 일본에서는 자양강장의 건강식품으로 소비가 증가하고 있지만 우리나라와 마찬가지로 공급량이 크게 부족하여 수요를 충족시키지 못하고 있다. 이러한 수요부족의 가장 큰 원인은 자연분주에 의한 산마늘의 번식은 연간 2-3배 밖에 증식되지 않고 실생번식의 경우는 종자과중에서 생체수확까지 4-5년의 긴 기간이 소요되는 등 번식률이 매우 낮기 때문에, 생산기간 단축방법에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

같은 *Allium*속에 속하는 마늘(*Allium sativum* L.)의 경우는 기내에서 우량마늘의 생산(Lee and Lee, 1994 a; Lee and Lee, 1994 b; Min et al., 1991) 및 미세번식(Choi et al., 1993)에 관한 연구가 많이 되어왔지만, 산마늘은 아직 조직배양적 측면에서의 접근이 시도되지 않고 있다. 따라서 본 연구는 산마늘 대량증식의 기반을 마련하고자, 기관 분화 및 체세포배발생에 의한 산마늘 기내 재분화 및 대량 생산 체계를 세우고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

공시재료

실험재료는 고려지 농업시험장 전시포에서 재배중인 산마늘을 이용하였다. 본잎이 2-3매 전개된 상처가 적은 깨끗

한 개체를 선별하여 잎과 인경(bulb) 부위를 나누어 각각 0.4% NaOCl 용액에서 20분간 진탕소독한 후 멸균증류수로 5회 세척하였다. 이때 인경은 겉껍질을 벗긴 후에 멸균소독하였다. 접종 재료는 2-3겹의 껍질을 벗겨낸 인경을 기부가 포함되도록 하여 0.5 cm 두께로 자른 인경조직과 0.3-0.5 cm 크기로 정단부를 절단한 경단(shoot tip) 및 잎조직을 사용하였다.

경단 및 인경조직배양에 의한

Direct Shoot 유도

경단, 인경조직 및 잎조직의 식물절편체로부터 신초를 직접 유도하였다. 신초 유도는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지를 기본으로 0.2 mg/L NAA에 BAP, kinetin 및 zeatin을 각각 1mg/L, 2mg/L로 복합처리한 조합구에서 비교하였다. 배양조직의 치상 개체수는 처리구당 6개체씩 10 반복으로 하였다. 25°C, 16/8 hr.의 명암조건에서 배양 2개월 후 배양절편체와 식물생장조절물질의 종류에 따른 신초형성률을 조사하였다. 또한 초기배양시 광의 유무에 따른 배양절편체의 분화 양상도 함께 살펴보았다.

본 실험에 사용된 배지는 특별한 언급이 없는한 MS 기본 배지에 3% sucrose, 0.8% agar를 첨가하고, pH는 5.8로 조정하였다.

배발생 캘러스 유도 및 신초 재분화

경단과 인경조직을 배양절편체로 사용하여 배발생캘러스

의 형성 정도를 비교하였으며 이로부터 shoot의 재분화를 시도하였다. 배발생캘러스 유도는 NAA, BAP 및 picloram 등 식물생장조절물질의 종류 및 농도를 달리한 조합구에서 실시하였고 25℃, 암조건에서 배양 5주 후 형성된 캘러스의 면적을 측정하여 캘러스의 생장 정도를 비교하였다. 또한 배발생캘러스로부터 신초 재분화는 MS 배지에 direct shoot 유도를 위해 사용하였던 식물생장조절물질을 첨가하여 25℃, 16/8 hr. 명암조건에서 7-8주 배양 후 재분화된 신초수를 조사하였다.

경단조직을 이용한 신초 대량생산

실험재료는 오대산, 울릉도, 지리산, 운두령에서 자생하는 묘의 경단조직을 BA 2.0 mg/l 와 NAA 0.2 mg/l 가 포함된 MS 기본배지에다 치상했다. 다른 배지조성 및 배양조건은 앞에서 언급한 바와 같이 했다.

III. 결과 및 고찰

경단 및 인경조직배양에 의한 Direct Shoot 유도

일반적으로 기내배양을 통한 식물체의 분화 및 탈분화는 식물의 종에 따라 심지어는 같은 종이라 할지라도 품종 및 계통에 따라서 그 능력에 차이를 보이는 등 모식물의 유전자형이나 배양에 이용되는 조직부위도 중요한 영향을 미치지만 배지의 조성, 배양조건과 방법에 따라서도 그 양상이 크게 상이한 것으로 알려지고 있다(Binh and Heszky, 1990; Data et al., 1990; Koetje et al., 1989).

본 실험에서 산마늘의 경단, 인경조직 및 잎조직으로부터 direct shoot의 분화에 미치는 식물생장조절물질의 효과를 살펴보았다.

잎조직을 절편체로 사용한 경우 대부분이 갈변현상을 나타내었고 줄기 형성은 관찰되지 않았으나 경단과 인경조직을 절편체로 사용하였을 때 direct shoot가 형성되었다. 이때 초기부터 광조건에서 배양했을 경우는 절편체가 분화하지 못하고 갈변 고사하는 현상을 보였다. 그러나 1주간 암조건에서 배양한 후 16/8 hr.의 조건에서 배양한 처리구의 경우는 지속적인 분화양상을 나타냈다. Direct shoot 유도는

산마늘의 인경조직을 0.2 mg/L NAA와 2.0 mg/L zeatin이 첨가된 배지에 치상했을 때 배양 4주 후 인경조직의 표면에 작은 돌기모양의 primordial shoot(Figure 1A)가 분화되었으며 그 형성률이 70% 이상으로 가장 양호하게 나타났다. 이렇게 분화된 백색의 primordial shoot는 점차 녹색을 띠며 성장(Figure 1B)하였고 3-4주 후 이로부터 다시 3-5개의 다발의 신초가 형성(Figure 1C)되는 것을 관찰할 수 있었다.

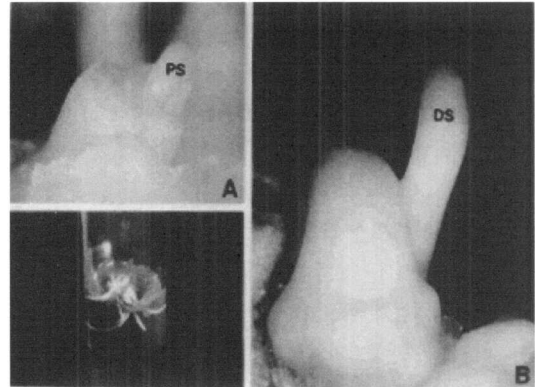


Fig. 1. Induction of direct shoot and plantlet from bulb explant of *A. victorialis*. A and B: Primordial shoot (PS) was induced, eventually forming direct shoot (DS) on MS medium supplemented with 0.2 mg/L NAA and 2.0 mg/L zeatin; C: After 7 weeks of culture, multiple shoots were formed.

마늘 경단 배양에 의한 신초 증식시 8 μ M BAP와 0.1 μ M NAA 조합이 효과적이었으며(Yasseen et al., 1994), *Allium trifoliatum*의 경우는 잎조직으로부터 신초 유도시 NAA와 고농도 BAP 조합이 유리하듯이(Ada et al., 1994) 대체적으로 저농도 NAA와 고농도 BAP 조합에서 신초 분화가 양호하다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 BAP 조합 처리보다 zeatin의 조합처리시 shoot 유기율이 1.5 - 2배 가량 높은 것으로 관찰되어 zeatin이 더 효과적인 식물생장조절물질로 사료되었다.

경단을 배양절편체로 사용한 처리구는 대부분의 치상체 자체가 하나의 신초로 성장하는 것으로 관찰되었다. 양과를 이용한 신초 증식 실험(Kahane, 1992)에서 경단의 정단부위

를 제거해 주었을 때 신초 증식이 잘 되었다. 이러한 결과를 종합해 보면 *Allium*속과 같이 정아우세(apical dominance) 현상이 강한 식물은 주정단(main apex)을 제거함으로써 정단우세현상을 타파하여 다수의 부정아를 발생시켜 증식율을 높일 수 있을 것으로 생각된다. 또한 배양절편체로부터 기관이 분화되는 양상은 식물재료의 부위에 따라서 차이가 있는 것으로 알려져 있는데 *Lilium speciosum* (Robb, 1975)과 *Lilium longiflorum* 의 인편배양시(Stimatt and Ascher, 1978) 그리고 백합의 엽배양시(Niimi and Onozawa, 1979) 부위에 따라서 분화능력에 차이가 있어 기부로 갈수록 재분화가 잘 된다고 보고한 바와 같이 본실험의 산마늘의 경우에도 경단 및 인경조직이 엽조직보다는 신초유도에 더 양호한 것으로 보여졌다.

배발생 캘러스 유도

산마늘의 경단과 인경조직으로부터 캘러스 형성에 미치는 식물생장조절물질의 효과를 보면, NAA, BAP 및 picloram 조합처리구 대부분에서 배양 4-5주 후에 캘러스 형성을 관찰할 수 있었다(Table 2).

본 실험에서 배양절편체로 shoot tip을 사용했을 때보다 인경조직을 사용하였을 때 배발생캘러스 형성이 더욱 양호하였으며 특히 0.2 mg/L NAA, 0.2 mg/L BAP 및 1.0 mg/L picloram이 첨가된 배지에 인경조직을 배양했을 때 유도된 배발생캘러스(Figure 2A)의 면적이 가장 넓은 것으

로 조사되었다. Auxin과 cytokinin의 사용은 배양절편체의 탈분화 및 분화에 있어 필수적 요소(Murashige, 1977)이나 이와같이 각 절편체에 따라 반응이 다른 것은 몇 가지 요인이 관여하고 있기 때문으로 추측된다. 그중 하나는 식물체 부위별 내생호르몬의 종류 및 함량 차이에 기인하며 이런

Table 2. Effect of plant growth regulators on the growth of embryogenic calli from shoot tip and bulb in *A. victorialis* after 5 weeks in culture.

Plant growth regulators (mg/L)			Embryogenic callus growth ^a	
NAA	BAP	Picloram	Shoot tip	Bulb
0.2	0.1	1.0	9.0	32.49
0.2	0.2	1.0	10.89	44.89
0.2	2.0	1.0	2.89	5.29
1.0	0.1	1.0	1.69	18.49
1.0	0.2	1.0	2.25	23.04
1.0	2.0	1.0	1.44	1.69
2.0	0.1	1.0	1.0	13.6
2.0	0.2	1.0	1.69	12.25
2.0	2.0	1.0	0.9	1.44

^a, Area(mm²) of embryogenic callus. Data were collected after 2 months of culture.

Table 3. Effect of plant growth regulators on shoot induction and regeneration from bulb explant in *A. victorialis*.

Plant growth regulators (mg/L)				Number of shoots / explant	
NAA	BAP	Kinetin	Zeatin	DS ^a	SE ^b
0.2	1.0	0	0	1.85 ± 0.02 ^c	2.75 ± 0.02
0.2	2.0	0	0	2.00 ± 0.02	2.75 ± 0.02
0.2	0	1.0	0	1.25 ± 0.02	1.75 ± 0.01
0.2	0	2.0	0	1.50 ± 0.01	2.00 ± 0.02
0.2	0	0	1.0	2.25 ± 0.03	3.25 ± 0.03
0.2	0	0	2.0	2.75 ± 0.02	4.25 ± 0.02

^a, Direct shoot induction.

^b, Somatic embryogenesis from bulb explant-derived embryogenic callus.

^c, Mean value ± SE.

요인이 식물전편체의 발생과 분화에 2차적으로 영향을 주기 때문인 것으로 사료된다.

배발생 캘러스로부터 신태 재분화

배발생캘러스를 재분화 배지에 계대배양하여 신태를 재분화하였다. Direct shoot 유도를 위해 사용했던 배지(0.2 mg/L NAA, 2.0 mg/L zeatin)에서 배발생 캘러스로부터 신태의 재분화도 잘되었다. 이는 일반적으로 성공적인 체세포배발생의 경우 배발생캘러스 형성에는 고농도의 auxin, 그리고 이들 배발생캘러스로부터 체세포배의 분화 및 발달에는 저농도의 auxin이 유리하다는 보고 (Fujimura and Komamine, 1979; Chen et al., 1985; Kawahara and Komamine, 1991)와는 달리 산마늘의 경우는 배발생캘러스의 유도 및 이로부터의 식물체분화시 저농도의 auxin이 유리한 것으로 보여졌다. 2개월간의 배양 후 callus의 표면에서 체세포배(Figure 2B, 2C)가 분화하는 것을 관찰할 수 있었으며 이들 체세포배는 점차 2개의 자엽이 전개된 모습과 유사한 신태로 분화(Figure 2D)하였고 마침내 1개의 캘러스 덩어리로부터 많게는 5-7개의 신태가 분화(Figure 2E)되었다.

본 실험을 통해 기관분화 및 체세포배발생에 의해 형성된 신태의 분화효율을 비교한 결과, Table 3에서와 같이 기부를 붙인 인경조직유래 배발생캘러스로부터 체세포배 유도를 통해 신태를 획득하는 것이 절편체로부터 직접 신태를 획득하는 것보다 더 효율적인 것으로 보여졌다.

물론 기관분화과정을 통해 얻어진 식물체는 배수성에 이상을 가져오기 때문에 대량번식방법으로 이용하는데 문제점이 있는 것으로 보여지나 최근들어 여러 식물종에서 체세포배발생과정을 통한 안정된 대량증식체계가 확립되었다. 따라서 본 실험 결과를 토대로 할 때 캘러스의 계대배양 횟수를 줄임과 동시에 체세포배발생을 통한 식물체 재분화 체계에 의해서 유전적으로 안정된 식물체의 기내 증식이 가능할 것으로 생각되었다.

경단조직을 이용한 신태 대량생산

4 개 지역에서 수집된 산마늘 4 계통은 형태적으로 약간의 차이점이 발견되었다. 본 논문에서는 보고되지 않았지만,

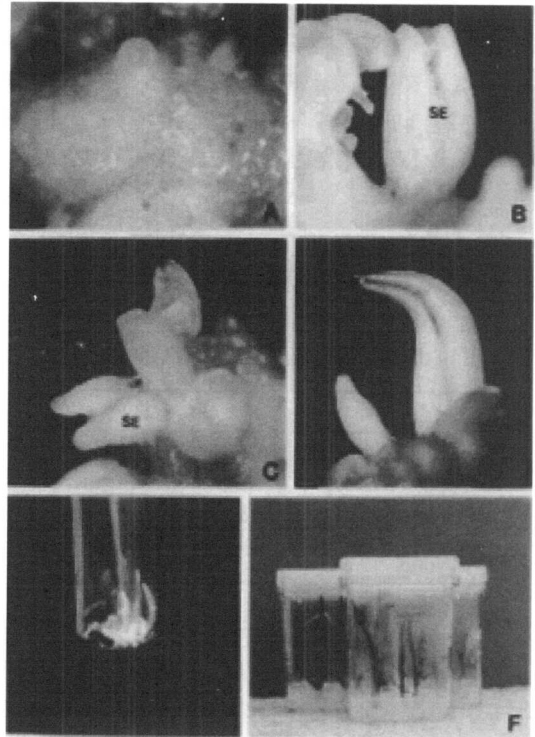


Fig. 2. Shoot and plantlet regeneration from embryogenic callus in *A. victorialis*. A: Pale-yellowish embryogenic callus formed on MS medium supplemented with 0.2 mg/L NAA, 0.2 mg/L BAP and 1.0 mg/L picloram; B and C: Somatic embryos (SE) at cotyledonary stage derived from embryogenic callus cultured on MS medium supplemented with 0.2 mg/L NAA and 2.0 mg/L zeatin; D: Shoot regeneration; E: Multiple shoots were regenerated from somatic embryos; F: Regenerated plantlets with leaves and roots in MS basal medium added with 1.0 mg/L NAA.

RAPD 방법에 의한 유연관계분석에서도 오대산과 운두령 계통이 유사했다. 한 개의 경단조직에서 다량의 신태를 생산하는 것이 가능하였다. 특히 지리산 계통의 경우는 최고 98개의 신태를 생산할 수 있어서 단시간에 상당한 양의 묘를 생산하는 것이 가능하다. 계통간에 차이가 있는 것은 아

직까지 정확하게 산마늘의 계통분류가 되어 있지 않기 때문에 좀더 자세한 계통분류를 통해서 본 결과에 대한 해석을 할 수 있을 것이다. 지금까지의 기초 분류자료에 의하면 계통간에 유전적인 조성의 차이가 크기 때문에 변식력에 있어서도 큰 차이를 보여 준 것으로 사료된다.

Table 4. Differences in micropropagation ability of four different *Allium victorialis* var. *platyphyllum* Makino depending on the collection areas.

Lines	Max no.	Min. no.	Average(S.D)
Odaesan	28	11	21.8(6.7) b
Ullngdo	22	2	7.69(6.2)c
Jirisan	98	31	55.4(19.3)a
Unduryung	49	5	18.4(13.5)b

지속적인 배양을 통해 인경과 잎이 형성된 재분화 개체는 MS 기본배지에 1.0 mg/L NAA를 첨가한 배지에서 4주간 배양함에 따라 여러개의 건전한 뿌리가 분화(Figure 2F)되었고 vermiculite와 pelrite가 1:1로 혼합된 토양에 옮겨질 때 활착되었다.

인용문헌

1. Ada V, Altman A, Rabinowitch HD (1994) In vitro propagation and germplasm cold-storage of fertile and male-sterile *Allium trifoliatum* subsp. *hirsutum*. Genetic Resources and Crop Evolution 41:87-98
2. Binh OQ, Heszky LE (1990) Restoration of the regeneration potential of long-term cell culture in rice (*Oryza sativa* L.) by salt pretreatment. J Plant Physiol 136:336-340
3. Chen TH, Lam L, Chen SC (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured inflorescence of *Oryza sativa* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 4:51-54
4. Choi YJ (1991). Usage and culture of mountain herbs. pp. 53-57.
5. Choi SY, Paek KY, Jo JT (1993) Plantlet production through callus culture in *Allium sativum* L. J Kor Soc Hort Sci 34:16-28
6. Data SK, Data K, Portrycus I (1990) Embryogenesis and regeneration from microspores of both 'indica' and 'japonica' rice (*Oryza sativa*). Plant Science 67:83-88
7. Fujimura T, Komamine A (1979) Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Physiol 64:162-164
8. Kahane R, Rancillac M, Teyssendier dela SB (1992) Long term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture 28:281-288
9. Kawahara R, Komamine A (1991) Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot. Korean J Plant Tissue Culture 18:334-339
10. Koetje DS, Grimes HD, Wang YC, Hodges TK (1989) Regeneration of indica rice(*Oryza sativa* L.) from primary callus derived from immature embryos. J Plant Physiol 135:184-190
11. Lee EM, Lee YB (1994 a) Systematic propagation of high quality garlic (*Allium sativum* L.) through shoot apical meristem culture. I. Organogenesis from in vitro cultured shoot tip. Korean J Plant Tissue Culture 21:161-166
12. Lee EM, Lee YB (1994 b) 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. Korean J Plant Tissue Culture 21:193-199
13. Min SR, Lee EM, Ra SW, Rho TH, Lee YB (1991) Effects of low temperature treatment and medium composition on callus proliferation and shoot differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) seed bulbs. Korean J Plant Tissue Culture 18:247-253
14. Murashige T (1977) Clonal crops through tissue culture. In Barz W, Reinhard E, Zenk MH, eds. Plant tissue culture and its biotechnological application.

- Springer-Verlag, Berlin, pp. 392-403
15. Murashige T, Skoog H (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*(cph) 15:473-497
 16. Niimi Y, Onozawa T (1979) In vitro bulblet formation from leaf segments of lilius, especially *Lilium rubellum* Baker. *Sci Hort* 11:379-389
 17. Robb SM (1975) The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* Thun. *J Exp Bot* 8:384-352
 18. Stimart DP, Ascher PD (1978) Tissue culture of bulb scale section for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *J Amer Soc Hort Sci* 103:182-184
 19. Yasseen MY, Splittstoesser WE, Litz RE (1994) In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36:243-247.