

최 중
연구보고서

농가보급체계 확립을 위한 마늘
무병우량종묘의 기내급속 증식기술개발 및
우량종묘의 포장적응성 검정

Establishment of a Novel *In Vitro* Culture for
Rapid multiplication of Virus-free Garlic Bulblet
and Its Practical Application to Field

연구기관

충남대학교 농업생명과학대학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농가보급체계 확립을 위한 마늘 무병우량종묘의 기내급속 증식 기술 개발 및 우량종묘의 포장적응성 검정” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 이 영 복

세부연구책임자 : 이 영 복

연 구 원 : 황 혜 연

협동연구기관명 : 충남농업기술원

협동연구책임자 : 권 경 학

연 구 원 : 김 경 제

연 구 원 : 김 현 숙

연 구 원 : 김 운 섭

요 약 문

I. 제 목

농가보급체계 확립을 위한 마늘 무병우량종묘의 기내급속 증식기술 개발 및 우량종묘의 포장적응성 검정

II. 연구개발의 목적 및 필요성

마늘은 감수분열시 염색체 대합이상으로 정상배우체가 형성되지 않아 인경번식에 의존하고 있으나 그 증식율이 대단히 낮아 유효 증식율은 쪽수의 80% 정도에 불과하다. 또한 파종수확기가 고정되어 있고, 년 1회만 영양세대로 성장하기 때문에 바이러스에 의한 수량감소가 심하며 재배마늘의 잠재 수량은 55% 내외에서 안정화 되는 것으로 추정되어 무병우량종구를 공급할 경우 수량성을 충분히 상승시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다.

더욱이 1999년 11월 중국산 냉동·초산마늘 긴급과세 부과에 대한 중국정부의 반발로 2002년말까지 중국마늘 저율관세 수입을 허용하고, 2003년 수입 자유화하기로 합의하였다. 따라서 마늘 재배농가의 반발이 심한 상태에서 2003년부터 WTO 도하개발어젠다(DDA) 농업협상이 시작됨에 따라 마늘 등 국내외 가격이 높은 작물의 경우 관세감축 요구가 거세질 것으로 전망된다. 또한 국내 마늘생산비가 중국의 생산비와 비교할 때 최고 10배에 달하며, 이 중 종구비가 30%, 노력비가 40% 차지함으로써 마늘의 경쟁력을 높이기 위해서는 종구비의 감축은 물론 우량종구의 공급으로 생산성을 향상시킬 것이 요구된다.

초창기의 바이러스에 이병되지 않은 우량종구의 생산은 생장점 배양에 의한 우량묘 생산에 초점을 두고 추진되어 왔다. 그러나 마늘과 같이 생장점배양에서 무병우량종구의 기내대량증식이 효율적이지 못할 경우에는 오히려 생장점의 채취작업이 노동효율성이나 채산성이 낮으므로 대중적으로 실용화되지 못하였다. 이에 대하여 충남기술원에서 추대기의 마늘 총포를 배양하여 20~50배로 유식물체를 증식할 수 있는 기술을 개발하였으나 총포의 이용으로 바이러스에 대한 안정성에도 문제성이 제기되고 있고 또한 포장 적응성 등 성능검사도 확인되고 있지 못하다.

따라서 본 연구에서는 생장점배양으로부터 얻어지는 무병주를 계대배양과정에서 획기적인 증식방법이 개발될 경우 안정된 우량종구의 보급이 실용화 될 수 있다는 견지에서 생장점 유래의 식물체로부터 대량증식을 유도하고, 대량증식된 유식물체로부터 우량종구로의 비대를 유도하는 일련의 과정을 탱크배양으로 증식의 효율성을 높이고자 하는데 목적을 두고 있다. 또한 생산된 소인경구를 소재로 농가보급을 추진하기 위해서 안정적인 공급을 도모하기 위해서 토양적응성도 동시에 확립하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내마늘 농사의 생산성을 제고하여 국제경쟁력을 높이기 위해서 필수적인 무병우량종묘의 공급을 목표로 수행되었다. 무병우량종구의 생산은 생장점배양으로부터 시작되지만 생장점배양에만 의존할 경우 경제성이 떨어지는 결점이 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기위해서 충남대학교와 충남농업기술원이 공동으로, 1) 마늘의 생장점배양을 기점으로, 2) 무병기본식물 육성을 위한 multiple-shoot의 분화를 유도할 수 있는 배지조성, 배양환경조건의 구명, 배양방식의 시스템을 확립하고, 3) 분화된 multiple-shoot로부터 양호한 인경구로의 분화가 효율적이고도 경제성 있게 이루어질 수 있는 체계를 확립하고자 하는데, 이 때 4) 생물반응기나 tank배양의 도입으로 무병우량종구를 경제적으로 생산할 수 있는 기술을 개발하며, 5) 기내 유식물체 및 기내소구를 이용한 우량종구 포장생산기술체계를 수립하여, 6) 5년 1기의 순환체제로 마늘의 우량종구를 갱신하여 농가에 보급할 수 있는 체계를 확립하기 위하여 다음과 같은 내용의 종합연구를 수행하였다.

1. 마늘 우량종묘의 기내급속 대량증식(충남대)

가. 마늘 우량종구 생산을 위한 경정배양 조건

- 1) 종구의 저온처리와 sucrose의 효과
- 2) 종구의 저온처리와 배양시의 일장의 효과
- 3) 종구의 저온처리와 생장조절물질의 영향
- 4) 종구의 저온처리와 배양온도의 영향
- 5) 배지 조성의 최적화
- 6) 신초의 분지에서 일장의 효과

- 7) 종구의 저온저장기간에 따른 배양온도 및 일장처리 효과
- 8) Sucrose 농도 차에 의한 shoot, bulbs 비교
- 9) 광질에 따른 shoot의 발생 및 bulbs형성의 비교
- 10) 성장조절물질이 첨가된 배지에서의 multiple-shoot 유도
- 11) 2iP 와 kinetine 및 IAA 조합처리에 따른 성장 비교
- 12) 총포배양에 의한 multiple-shoot 유도
- 13) 광도에 따른 shoot, bulb형성의 비교

나. 생물반응기를 이용한 대량배양시스템 개발

- 1) 성장조절물질의 효과
- 2) Bioreactor를 이용한 마늘 기내구 비대 및 성장 비교
- 3) Tank배양을 이용한 기내구 형성 및 비대유도
- 4) multiple-shoot 유도배지에서의 multiple-bulb비대
- 5) Shoot & bulb의 수에 따른 구비대 실험
- 6) multiple-shoot 유도배지와 CCC 첨가에서의 구비대
- 7) Sucrose 농도차에 따른 마늘 구비대 실험
- 8) 성장점 배양 기간 중 성장조절물질의 첨가에 따른 구비대
- 9) 액체 tank배양을 통한 multiple-bulb 생산
- 10) 기내배양형성 소인경구의 포장적응성

2. 마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급체계 확립(충남농업기술원)

- 가. 총포배양 유래 유식물체 순화를 위한 온실 재배조건 구명
- 나. 마늘 총포배양에 의한 유식물체 대량증식
- 다. 총포배양 유식물체에서 형성된 단구 포장 적응성 및 생산력 검정
- 라. 기내 유식물체 순화 조건 구명
- 마. 기내자구 저장조건에 따른 생육 및 수량성 비교
- 바. 무병종구 년차별 바이러스 이병을 조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 마늘 우량종묘의 기내급속 대량증식

가. 마늘 우량종구 생산을 위한 경정배양 조건

마늘의 무병우량종구의 생산을 위한 경정배양에서 분화된 유식물체의 생체중이나 분화된 엽수는 모두 재료를 4℃에서 1개월간 저장했던 저온처리구가 대조구인 실온 저장구에 비해 양호하였다. 저온처리구의 8% sucrose 배양구에서는 엽수의 분화가 현저하게 많았으며, 생체중이나 다신초 분화의 효과가 장일조건 하에서 뚜렷하게 나타났다. 장일(16/8)과 25℃에서 3개월간 배양한 결과, BA 2 + NAA 0.2mg · L⁻¹구에서 생체중에 가장 높은 수치를 보이면서 신초의 분화가 양호했지만 엽수는 생장조절 물질의 무처리구에 비해 저조했다. 다신초의 분화나 잎의 분화, bulb의 형성의 종합적으로는 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹구가 효과적이었다.

배양전 종구를 4℃에서 각각 30, 40, 50, 60일 동안 저장한 후, 20℃와 25℃의 두 처리구를 설정하고 8시간과 16시간의 장일로 배양하였을 때, 40일 이상의 저장구에서 shoot, bulb의 형성이 현저히 양호했다. 30일 정도의 저온처리에 의해서는 휴면이 완전히 타파되지 않은 것으로 판단할 수 있다. 그러나 40일간 저온저장처리구에서도 20℃, 8시간 단일처리구에서 shoot의 발생 및 bulb의 형성이 가장 양호하였다.

전반적으로 저장기간이 40일이 경과한 후에는 큰 차이가 없었으나 저장 기간이 점차 길어질수록 배양온도 높아지거나 장일조건하에서 양호한 양상을 보였다. 즉 30일간이나 40일간의 저장의 경우 20℃와 8시간의 단일에서 가장 양호하였으나, 50일 저장에서는 20℃와 16시간의 장일, 60일의 경우에는 25℃와 16시간의 장일처리에서 shoot와 bulb의 발생이 양호하게 나타났다.

생장점배양에서 당은 식물체의 전분축적을 위한 중요한 탄수화물 급원이기 때문에 shoot형성과 bulb의 비대에 필수적 요소라 할 수 있다. 그러나 30일간의 초기단계에서는 shoot 발생이나 기내구 형성 모두 sucrose 3%가 8% 보다 양호하였다.

광질의 효과는 60일간의 배양에서 8% sucrose의 경우에는 광질에 따른 차이가

뚜렷하여 청색광이나 근적외선광 보다 적색광하에서 shoot의 분화나 기내 인경구의 형성에 효과가 높았다. Sucrose 8% 배지에서는 적색광 하에서의 kinetin 2 +NAA 0.2mg · L⁻¹구가 shoot 및 bulb의 형성이 매우 양호한 결과를 보였다. 그러나 3% sucrose배지에서는 청색광하에서의 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹구에서 양호하였다.

Sucrose 3%가 첨가된 MS 기본배지에 각각 다른 cytokinin류의 생장조절물질 BA와 kinetin, auxin류의 IAA와 NAA의 첨가는 shoot 발생과 bulb형성에 큰 영향을 주었다. 생장점배양개시 30일 경과 후의 shoot와 bulb 형성에는 BA + NAA처리에 비해 kinetin + IAA의 효과가 양호하였고, multiple-shoot의 분화유도에는 kinetin보다 2iP의 효과가 양호하였다.

나. Shoot-bud 이용한 생물반응기배양 시스템 개발

고체배지배양 보다 대형화의 가능성이 있는 생물반응기배양 시스템을 개발하여 실용화하고자 하였다. 5L 생물반응기에서 액체배양을 할 경우에는 어느 처리구에서나 고체배지에서보다 생육이 비교되지 않을 정도로 왕성함을 알 수 있었다. 다만 BA 2 + NAA 0.2mg · L⁻¹의 비교적 생장조절물질의 농도가 높았던 LS배지의 경우에는 MS배지에 비해 신초의 생육이 비정상적이거나 수침상(vitrification)으로 고사하는 경우가 많이 나타났다. BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹의 처리구에서는 MS배지나 LS배지 어느 경우에서나 생육이 양호하였지만 MS배지의 경우에는 발근 상태가 양호하였고, 인경구의 분화가 가시적으로 나타났다. LS배지의 경우에는 지상부의 발육은 보다 양호하였으나 발근이나 인경구의 분화는 MS배지에 비해 저조하였다.

생장조절물질을 첨가하지 않은 배지에서는 MS배지나 LS배지경우에서는 발근상태가 뚜렷하게 양호하였고 인경구의 분화도 현저하였다. 특히 MS배지에서는 거의 모든 이식체에서 직경 7 mm 이상의 비교적 대형의 인경구가 분화되어 토양이식에 충분할 정도의 소인경구를 단기간에 획득할 수가 있었다.

따라서 생물반응기나 tank의 이용은 단기간에 우량한 소인경구의 획득의 가능성 배양액의 교체가 용이하기 때문에, 초기 2개월에는 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹배지에서 배양을 한 후 중반 이후에 생장조절물질이 포함되지 않은 MS배지로 옮겨 약 45일간 계대배양을 할 경우 대형의 소인경구를 단기간에 생산할 수 있었다. 또한 tank배양에서 3개월 이상의 장기배양에서는 당의 농도가 증가될 수록 구비대의 효과는 있었지만 경제성이 낮아지므로 3% 이하의

적은 양의 당을 사용해서 2개월 이내의 단기간에 multiple-shoot와 실용 가능한 bulb의 비대를 증진시킬 수 있는 방법이 바람직하고 또 가능성도 충분하였다.

생장점으로부터 분화된 multiple-shoot와 bulb를 tank배양으로 대량생산하기 위한 활용방안으로 15L 시판용 생수통을 이용하여 배양을 하였다.

생장점을 sucrose 3%의 MS고체배지에 치상한 후 25℃, 16시간의 일장으로 30일 동안 배양한 후, sucrose 8%가 첨가된 액체배지에 옮겨 tank 배양을 실시하였다. BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹처리구에서 생체중, 근중, 구중이 양호했다. BA를 0.2mg · L⁻¹으로 고정시켰을 때 NAA 농도가 증가할 수록 생육이 현저하게 저하되고 구의 비대가 이루어지지 않았다. Multiple-shoot 유도조건이었던 kinetin 4.0 + IAA 0.2mg · L⁻¹처리구에서는 bulb가 형성되는 기부부위에 심한 callus화와 유리화 현상이 나타나며 고체배지에서 유도된 multiple-shoot가 bulb로 비대되지 않는 못하는 경우가 많았다. 따라서 구비대에 있어서 마늘의 초기 생장점 배양시 2iP 2.0mg · L⁻¹ + IAA 0.2mg · L⁻¹에서 배양하는 것이 우량종구로의 bulb 생산에 효과적이었다.

구비대 단계에서 계대이식하는 shoot의 상태를 날개, shoot의 3개 다발, 5개 다발로 분리하여 25℃, 16시간 일장으로 45일간 배양한 결과, 3개체 다발에서 평균 2.5개의 양질의 bulb를 생산해 낼 수 있었다

CCC 700mg · L⁻¹처리구에서는 대조구에 비해 외피부위가 자색이나 황색으로 착색되면서 multiple-bulb로 비대되는 것을 뚜렷하게 볼 수 있었으나, callus화에 의한 bulb의 손실이 많았다. 또한 ascorbic acid 500mg · L⁻¹처리구에서도 구비대는 매우 저조하였다.

생장점을 2개월 동안 배양하여 multiple-shoot를 유도한 후, 3개씩 한 덩어리가 되도록 shoot를 분리하여 시판용 10L tank의 기본 MS액체배지에 옮겨 25℃, 16시간 일장으로 45일간 배양한 결과, 형성된 기내구의 생체구경이나 생체중, 풍건시킨 후의 직경과 무게가 8%의 sucrose 첨가한 조건에서 약간 양호하였다. 그러나 최종적으로 생산된 bulb의 수량에 있어서는 sucrose 3% 첨가조건에서 양호한 효과를 보였다.

실험에서 생산된 muliti-bulb를 단구로 분리하여 풍건시킨 후 직경 0.5~1.0, 1.0~1.5cm의 크기로 구분하여 포장적응성을 검토한 결과, 직경 0.5~1.0cm의 구의 생육

이 1.0~1.5cm구 보다 더 양호한 결과를 보였다. 이 들은 통구로 분화된 것들도 있었지만 3~4개 인편의 마늘로 분화된 것들이 많았다.

본 실험에서는, multiple-shoot의 유도단계에서는 sucrose 3%, $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA를 처리한 MS고체배지에서 배양하여 multiple-shoot를 유도하였다. multiple-shoot가 분화된 후 이 multiple-shoot를 3개 단위로 분리하여 multiple-bulb의 생산단계로 tank배양으로 옮겼다. 이 때는 성장조절물질을 처리하지 않고 sucrose 3%를 첨가한 MS액체배지에서 45일간 배양하여 충실한 multiple-bulb 생산해 낼 수 있는 최종적인 방안을 확인하였다. 또한 포장에서의 증식을 위한 중구의 크기는 직경 10mm내외의 크기면 충분한 것으로 판명되었다.

2. 마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급체계 확립(충남농업기술원)

마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급 체계 확립을 위하여 기내배양묘의 순화 조건 및 저장조건, 포장 생산력 검정을 수행한 결과는 다음과 같다.

가. 총포배양 유래 유식물체 순화를 위한 재배조건 중 차광은 흑색 차광망 55% 가 가장 좋았고, 순화 상토는 peatmoss와 vermiculite를 50%:50%로 혼합한 것이 가장 좋았다.

나. 마늘 유식물체 대량증식을위한 총포배양시 BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 NAA $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 처리가 초기 생존율과 신초유도에 유리 하였으며, BA와 NAA의 처리농도에 따른 계대배양 후 식물체분화처리에서 BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 NAA 전체 혼용처리구에서 신초수가 많았다.

다. 총포 유식물체에서 형성된 단구의 포장 적응성은 3.5g 이상 > $1.6\text{g} \sim 3.4\text{g} > 1.5\text{g}$ 이하의 순으로 초장, 엽수, 경경 등 생육이 좋았다

라. 기내배양 유식물체 순화 상토는 지상부생육이 양호하였던 피트모스 : 버미큘라이트:필라이트:발흙을 30:20:30:20의 비율로 혼합한 경우가 가장 유리하였다.

마. 기내소구는 4°C 저장 후 재배하는 것이 생육 및 수량 모두 양호 하였다.

바. 무병종구 년차별 생육상황은 2, 3년차에서 생육이 좋았고, 년차별 바이러스 이병조사 결과 OYDV, Potyvirus group, TMV 모두 이병되지 않았다.

SUMMARY

Establishment of a Novel *In Vitro* Culture for Rapid multiplication of Virus-free Garlic Bulblet and Its Practical Application to Field

This work was carried out to establish a novel *in vitro* culture for rapid multiplication of virus-free garlic bulblet and its practical application to field to improve by productivity of domestic garlic agriculture, and to raise competition in the international market.

Having virus-free garlic begins with shoot tip culture, but there is a weak point at last to lose economy to lean on only shoot tip culture. Therefore, we attempted to establish the medium composition that could induce the differentiation of multiple-shoots and the formation of bulblets of high quality from the multiple-shoots *in vitro* for production virus-free plant of garlic with shoot-tip culture as starting point, culture environment condition and a system of a culture method.

Bioreactor or tank culture system were improved to establish the system which could produce high quality seed bulbs as virus-free from differentiated multiple-shoots inexpensively and more effectively. In addition, farm manufacturing technique was established to produce the high quality seed bulbs which used *in vitro* bulblets and it could be supplied new seed bulbs in a farmhouse by the circulation system in one period for five years. And the results obtained through this research are explained as follows;

1. *In vitro* culture for rapid multiplication of virus-free garlic bulblet

A. The environmental condition of shoot tip culture for virus-free garlic bulblet

The fresh weight and a leaf numbers of shoots which differentiated in shoot tip culture with the low temperature stored materials at 4°C for one month compared for production of virus-free high quality seed bulbs of garlic with the room temperature storage was desirable. Differentiation of the number of the leaves was remarkable in 8% sucrose treatment of a room temperature storage, and fresh weights of shoots and multiple-shoots differentiation were increased significantly under long daylength treatment. As a result of culture under long daylength (16/8) and at 25°C for three months, differentiation of multiple-shoots was remarkable while showing the highest numerical value to fresh weight on the MS medium complemented with BA 2 mg·L⁻¹ and NAA 0.2 mg·L⁻¹, but the number of the leaves was low in comparison with control of growth regulator. The overall effects for the differentiation of multiple-shoots, the leaf emergence, and formation of bulblets were desirable on the MS medium containing BA 0.2 mg·L⁻¹ and NAA 0.02 mg·L⁻¹.

When shoot tips of garlic were cultured with the materials stored at 4°C for 30, 40, 50 and 60 days, the differentiation of multiple-shoot and formation of bulblets was remarkable at 20°C and under short day of 8 hours by using the garlic which stored up low temperature more than 40 days. There was not the difference that was significant if a storage period suffered generally than 40 days, however, high temperature and long periodism showed a demanded tendency so that a storage period got longer. neither more nor less, The formation of shoots and bulblets was desirable at 20°C under daylength of 8 hours in the storage for 30 days or 40 days, however, at 20°C under daylength of 16 hours in the storage for 50 days and at 25°C under daylength of 16 hours in the storage for 50 days.

Because sucrose is important carbohydrates source of supply for accumulation of starch of a plant body by shoot tip culture, sucrose is the important element for shoot differentiation and bulb formation. At an initial culture stage of 30 days, shoot differentiation and bulb formation was vigorous on the medium

containing 3% of sucrose than 8% of it. Shoot differentiation and bulb formation for 60 days on the medium of 8% sucrose was increased significantly under red light than far-red or blue light and the red light has had no appreciable effect by culturing on the MS medium supplemented with kinetin $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, however, the effectiveness was changed on the 3% sucrose medium and the formations was efficient under blue light by supplementation with BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

B. Introduction of bioreactor system for the culture with multiple-shoots of garlic

We developed bioreactor cultivation or tank culture system which there was possibility of upsizing in than solid medium cultivation and intended to be in use.

When shoots were cultured in bioreactor that capacity was 5 L, any kind of treatment, growth of the shoots was not compared than in solid medium cultivation.

Unfortunately, a lot of cases that growth withered and died in non-normal mark and vitrification appeared on LS medium that the density of a plant growth substances were comparatively high as BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Growth was good even in the case of MS medium and an LS containin containing BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, but a rooting state was better in the case of MS medium and differentiation of a bulb showed visually. The growth of an above ground part was better in the case of LS medium, but the rooting and the differentiation of a bulblet were poor in comparison with MS medium but The growth of rrot and bulblet formation were increased by culture in the liquid medium without plant growth substances.

Furthermore, comparatively large-scale bulbs which was bigger than a diameter of 7mm was able to produce seed bulb of the rank that was enough for soil transplant in most explants in MS medium in a short term because it was differentiated. Therefore, because the use of bioreactor or tank can produce desirable bulbs in a short period and the exchange of medium is easy, large-scale bulbs could be produced in MS liquid medium without substances in

tank for 45 days of the latter period by subculture with multiple-shoot obtained after shoot-tips were cultured for two months of the first cultivation on the MS solid medium supplemented with BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

The bulbs of garlic came to like growth so that concentration of sugar increases in long term culture of tank more than three months. The method that could be used sucrose equal to or less than 3% because economy lowered by this method to supply sugar of much quantity in long term culture and increased enlargement of multiple-shoot and bulbs which it could be put to practical use for the short period less than two months were desirable and did possibility enough again.

We used 15 L marketing drinking-water tank in the side of practical use plan to produce bulbs in tank culture with multiple-shoots differentiated by shoot-tip in large quantities and cultured it.

Following shoot-tip culture for 30 days at 25°C and under daylength of 16 hours on the solid MS medium, the shoots were transferred into MS liquid medium of tank containing 8% sucrose and subcultured.

Fresh weight of explants, weight of roots, weight of bulbs were increased on the MS medium of BA $0.2 + \text{NAA } 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, however, when BA was fixed at $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the growth of bulbs were decreased clearly and to serious case bulbing of garlic did not become accomplished by the increase of NAA concentration. In treatment of kinetin $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and IAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with MS medium as the condition of induction of multiple-shoots, dedifferentiation to callus and vitrification occur at the basal part that bulb forms and therefore multiple-shoots induced on the solid media were not enlarged in bulb, there was much. So in tuberization of garlic in vitro the early cultivation of shoot-tip on the MS medium supplemented with 2iP $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and IAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was efficient for the production of high-quality bulbs.

When single shoot, three-shoots, or five-shoots at one cluster that bud off from multiple-shoots were cultured in the state that cut off leaflets at 7 mm of base for 45 days at 25°C under daylength of 16 hours in the liquid MS medium

in tank, bulbs of average 2.5 good-quality were produced from the three-shoots at one cluster.

It was seen clearly that shoots were formed in bulbs while the outside of bulbils cultured on MS liquid medium containing CCC $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in tank were colored with purple or yellow in comparison with control, but there were many losses of bulb by dedifferentiation. Treatment of ascorbic acid $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was not desirable for the formation of bulb.

Following inducing multiple-shoots by shoot-tip culture for 60 days, the three-shoots at one cluster separated from the multiple-shoots were subcultured for 45 days at 25°C under daylength of 16 hours on the MS liquid medium without growth substances in tank. Diameter and weight of both fresh bulblets and air-dried bulblets were a little increased by supply of sucrose as 8% concentration, in spite of that, supply of sucrose as 3% concentration was more effective in amount of bulbs induced.

Multiple-bulbs were separated with size of a diameter of 0.5-1.0 cm and 1.0-1.5 cm of single bulb and were air-dried and examined farm utility. Growth of a bulb of a diameter of 0.5-1.0 cm showed one good result than 1.0-1.5 cm bulb. As for these, differentiation tended to have become it with garlic of single-bulb and three or four clove in soil.

In this research, the shoot-tip culture is '**a inducing stage for multiple-shoots**' of virus-free garlic and, at this stage, we can induce the much multiple-shoots on the MS solid medium supplemented with sucrose 3%, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2iP and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA for 60 days. The multiple-shoots were divided off into the three-shoots at one cluster and subcultured in MS liquid medium in tank. We call this subculture '**a stage of bulbil production**' of garlic. At this stage, we could also produce a lot of valuable mini-bulbils from the tank culture

with MS liquid medium containing sucrose 3%. The shoots were cultured for 45 days at 25°C under 16 hours daylength. In addition, as for the size of bulb for an increase in a farm, it was judged that size of a diameter of around 10 mm was enough.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the study subject	18
Section 1. Objective and necessity of the study	18
Section 2. Contents and category of the study	19
Chapter 2. Present state of the study in domestic and overseas	21
Chapter 3. Research and development contents and results	23
Section 1. Research and development contents	23
Section 2. Results and discussion	33
Chapter 4. Achievement of research purpose and its contribution to the related research field	109
Chapter 5. Application plan of the results	114
Chapter 6. Scientific and technological information obtained from the study process	115
Chapter 7. References	116

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	18
제 1 절	연구개발의 목적 및 필요성	18
제 2 절	연구개발 내용 및 범위	19
1.	마늘 우량종묘의 기내급속 대량증식(충남대)	19
가.	마늘 우량종구 생산을 위한 경정배양 조건	19
나.	생물반응기를 이용한 대량배양시스템 개발	20
2.	마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급체계 확립(충남농업기술원)	20
가.	충포배양 유래 유식물체 순화를 위한 온실 재배조건 구명	
나.	마늘 충포배양에 의한 유식물체 대량증식	
다.	충포배양 유식물체에서 형성된 단구 포장 적응성 및 생산력 검정	
라.	기내 유식물체 순화 조건 구명	
마.	기내자구 저장조건에 따른 생육 및 수량성 비교	
바.	무병종구 년차별 바이러스 이병율 조사	
제 2 장	국내외 기술개발 현황	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절	연구수행 내용	23
1.	마늘 우량종묘의 기내급속 대량증식(충남대)	23
가.	마늘 우량종구 생산을 위한 경정배양 조건	23
나.	생물반응기를 이용한 대량배양시스템 개발	27

2. 마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급체계 확립(충남농업기술원) ..	30
가. 총포배양 유래 유식물체 순화를 위한 온실 재배조건 구명	30
나. 마늘 총포배양에 의한 유식물체 대량증식	31
다. 총포배양 유식물체에서 형성된 단구 포장 적응성 및 생산력 검정	31
라. 기내 유식물체 순화 조건 구명	32
마. 기내자구 저장조건에 따른 생육 및 수량성 비교	32
바. 무병종구 년차별 바이러스 이병율 조사	32
제 2 절 연구결과 및 고찰	33
1. 마늘 우량종묘의 기내급속 대량증식(충남대)	33
가. 마늘 우량종구 생산을 위한 경정배양 조건	33
나. 생물반응기를 이용한 대량배양시스템 개발	63
2. 마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급체계 확립(충남농업기술원) ..	99
가. 총포배양 유래 유식물체 순화를 위한 온실 재배조건 구명	99
나. 마늘 총포배양에 의한 유식물체 대량증식	101
다. 총포배양 유식물체에서 형성된 단구 포장 적응성 및 생산력 검정	103
라. 기내 유식물체 순화 조건 구명	105
마. 기내자구 저장조건에 따른 생육 및 수량성 비교	107
바. 무병종구 년차별 바이러스 이병율 조사	108
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	109
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	114
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	115
제 7 장 참고문헌	116

1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

마늘은 감수분열시 염색체 대합이상으로 정상배우체가 형성되지 않아 인경번식에 의존하고 있으나 그 증식율이 대단히 낮아 유효 증식율은 쪽수의 80% 정도에 불과하다. 또한 과중수확기가 고정되어 있고, 년 1회만 영양세대로 성장하기 때문에 바이러스에 의한 수량감소가 심하며 재배마늘의 잠재 수량은 55% 내외에서 안정화 되는 것으로 추정되어 무병우량종구를 공급할 경우 수량성을 충분히 상승시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다.

더욱이 1999년 11월 중국산 냉동·초산마늘 긴급과세 부과에 대한 중국정부의 반발로 2002년말까지 중국마늘 저율관세 수입을 허용하고, 2003년 수입 자유화하기로 합의하였다. 따라서 마늘 재배농가의 반발이 심한 상태에서 2003년부터 WTO 도하개발어젠다(DDA) 농업협상이 시작됨에 따라 마늘 등 국내외 가격이 높은 작물의 경우 관세감축 요구가 거세질 것으로 전망된다. 또한 국내 마늘생산비가 중국의 생산비와 비교할 때 최고 10배에 달하며, 이 중 종구비가 30%, 노력비가 40% 차지함으로써 마늘의 경쟁력을 높이기 위해서는 종구비의 감축은 물론 우량종구의 공급으로 생산성을 향상시킬 것이 요구된다.

초창기의 바이러스에 이병되지 않은 우량종구의 생산은 생장점 배양에 의한 우량묘 생산에 초점을 두고 추진되어 왔다. 그러나 마늘과 같이 생장점배양에서 무병우량종구의 기내대량증식이 효율적이지 못할 경우에는 오히려 생장점의 채취작업이 노동효율성이나 채산성이 낮으므로 대중적으로 실용화되지 못하였다. 이에 대하여 충남기술원에서 추대기의 마늘 총포를 배양하여 20~50배로 유식물체를 증식할 수 있는 기술을 개발하였으나 총포의 이용으로 바이러스에 대한 안정성에도 문제성이 제기되고 있고 또한 포장 적응성 등 성능검사도 확인되고 있지 못하다.

따라서 본 연구에서는 생장점배양으로부터 얻어지는 무병주를 계대배양과정에서 획기적인 증식방법이 개발될 경우 안정된 우량종구의 보급이 실용화 될 수 있다는 견지에서 생장점 유래의 식물체로부터 무병우량유식물체의 대량증식을 유도하고, 대량증식된 유식물체로부터 우량종구로의 비대를 효율적이고도 경제적으로 유도하는 일련의 과

정으로 탱크배양을 도입하여 우량한 마늘의 종구생산을 공장생산으로 전환시켜 증식의 효율을 극대화하는데 목적을 두고 있다. 또한 생산된 소인경구를 소재로 농가보급을 추진하기 위해서 안정적인 공급을 도모하기 위해서 종구의 규격에 따르는 토양적응성도 동시에 확립하고자 한다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내마늘 농사의 생산성을 제고하여 국제경쟁력을 높이기 위해서 필수적인 무병우량종묘의 공급을 목표로 수행되었다. 무병우량종구는 생장점배양으로부터 시작되지만 생장점배양에만 의존할 경우 경제성이 떨어지는 결점이 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해서 충남대학교와 충남농업기술원이 공동으로, 1) 마늘의 생장점배양을 기점으로, 2) 전 단계로서 무병기본식물 육성을 위한 multiple-shoot의 분화를 유도할 수 있는 배지조성, 배양환경조건의 구명, 배양방식의 시스템을 확립하고, 3) 분화된 multiple-shoot로부터 양호한 인경구로의 분화가 효율적이고도 경제성 있는 체계를 확립하고자 하는데, 이 때 4) 생물반응기나 탱크배양의 도입으로 무병우량종구를 경제적으로 생산할 수 있는 이른바 공정생산기술을 개발하며, 5) 기내 유식물체 및 기내소구를 이용한 우량종구 포장생산기술체계를 수립하여, 6) 마늘 5년 1주기의 순환체제로 우량종구를 갱신하여 농가에 보급할 수 있는 보급체계를 확립하기 위하여 다음과 같은 내용의 종합연구를 수행하였다.

1. 마늘 우량종묘의 기내급속 대량증식(충남대)

가. 마늘 우량종구 생산을 위한 경정배양 조건

- 1) 종구의 저온처리와 Sucrose의 효과
- 2) 종구의 저온처리와 배양시의 일장의 효과
- 3) 종구의 저온처리와 생장조절물질의 영향
- 4) 종구의 저온처리와 배양온도의 영향
- 5) 배지 조성의 최적화
- 6) 신초의 분지에서 일장의 효과
- 7) 종구의 저온저장기간에 따른 배양온도 및 일장처리 효과

- 8) Sucrose 농도 차에 의한 shoot, bulbs 비교
- 9) 광질에 따른 shoot의 발생 및 bulbs형성의 비교
- 10) 성장조절물질이 첨가된 배지에서의 multiple-shoot 유도
- 11) 2iP 와 kinetine 및 IAA 조합처리에 따른 성장 비교
- 12) 총포배양에 의한 multiple-shoot 유도
- 13) 광도에 따른 shoot, bulb형성의 비교

나. 생물반응기를 이용한 대량배양시스템 개발

- 1) 성장조절물질의 효과
- 2) Bioreactor를 이용한 마늘 기내구 비대 및 성장 비교
- 3) Tank배양을 이용한 기내구 형성 및 비대유도
- 4) multiple-shoot 유도배지에서의 multiple-bulb비대
- 5) Tank배양시 이식하는 shoot와 bulb의 수에 따른 구비대 효과
- 6) multiple-shoot 유도배지와 CCC 첨가에서의 구비대
- 7) Sucrose 농도차에 따른 마늘 구비대 실험
- 8) 성장점 배양기간 중 성장조절물질의 첨가에 따른 구비대
- 9) 액체 tank배양을 통한 multiple-bulb 생산
- 10) 기내배양형성 소인경구의 포장적응성

2. 마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급체계 확립(충남농업기술원)

가. 총포배양 유래 유식물체 순화를 위한 온실 재배조건 구명

나. 마늘 총포배양에 의한 유식물체 대량증식

다. 총포배양 유식물체에서 형성된 단구 포장 적응성 및 생산력 검정

라. 기내 유식물체 순화 조건 구명

마. 기내자구 저장조건에 따른 생육 및 수량성 비교

바. 무병종구 년차별 바이러스 이병율 조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

초창기의 우량종구 생산은 생장점배양에 의한 우량묘 생산에 주력하여 추진되어 Lee와 Lee(1994a, 1994b, 1994c)는 이에 대한 강범위한 연구를 수행하였으나 종래의 배양방법으로는 증식속도가 늦어 농가보급사업에 어려움이 있을 것으로 판단하였다. 따라서 생장점배양의 단독 응용만으로는 생장점 채취작업에 노력과 경비가 많이 들어가고, 대량증식이 곤란하여 실용화되지 못하고 있다.

충남기술원에서는 추대기의 마늘 총포를 배양하여 20~50배로 유식물체를 증식할 수 있는 기술을 개발하였으나 포장 적응성 등 성능검사에서 안전한 무병종구로서의 뚜렷한 확신을 세우지 못하고 있다. 과거 국내의 D물산에서 독보적으로 마늘의 생장점배양에서 다신초 배양기술의 개발에 많은 노력을 경주하여 이론적으로 연간 5천억배의 증식기술이 가능하다고 확신하여 사업을 추진해 왔으나 현재까지 단구 및 정상구 생산 기술 개발에는 아직 실용화 되지 못하고 있는 실정이다.

이러한 현실을 감안해서 농촌진흥청에서는 농림부의 마늘 경쟁력 강화 시책 추진사업으로 주아재배를 통한 종구생산기술을 보급하고 있다. 이 방법에 의할 때, 종구비용을 대폭 절감할 수 있고, 공중에 착생되어 토양전염성 병충해의 감염이 적으며 바이러스의 감염도도 낮아 수량증수 효과가 높고(15%) 종구로써 이용가치가 매우 높다고 인정된다. 그러나 이 방법만으로는 전환에도 많은 애로사항이 내재되고 있으므로 완전한 무병우량종구의 생산은 생장점배양에 의한 종구생산이 가장 이상적이다. 생장점배양에서의 결점만 보완하여 해결될 수 있는 기술의 확립이 매우 필요한 실정이다.

2) 외국

- 마늘의 생장점에서 1개 내지 수개의 신초를 만들어 내거나(Mirghis et al. 1989), 혹은 캘러스를 유도하여 신초를 재분화시켜 대량증식하는 방법(Kita 등, 1989).
- 일본 쓰미모토화학에서 개발한 생장점에서 신초를 유도한 다음 이를 계대배양하여 증식시킨 후 기내소구 씨마늘을 생산하는 방법(Nagakubo 등, 1993),
- 생장점에서 미분화 신초덩어리를 유도하여 이것을 증식한 다음 다수의 신초를 만들어 저온에서 기내소구 씨마늘을 생산 묘조원기법이 있음(Yoshida 등, 1989)
- 최근에는 인편내 disk를 배양하여 인편 사이의 액아부분의 1mm 이하의 다수 dome를 배양하여 다수의 신초를 유도한 바 있음(Ayaba와 Sumi, 2001).

- 지금까지 개발된 방법중 다신초법이 생산성이 가장 높은 것으로 알려지고 있는데 다신초의 증식률이 매우 높고 기간도 짧다는 장점이 있으나 기내소구 씨마늘의 포장재배 시 발아율이 저조하다는 등 아직 해결해야 할 부분이 많은 실정임.
- 기내배양이 실제 종묘산업에 이용되기 위해서는 수량적인 대량증식의 체계확립 뿐만 아니라 질적인 대량증식의 체계확립이 필요

다. 앞으로 전망

- 현재까지 개발된 기술은 비용이 많이 소요되기 때문에, 효율적인 무병주 육성 기술 및 농가 보급 생산체계의 기술 개발이 필요함.
- 즉 조직배양이 산업화에 성공하기 위해서는 조직배양에서의 비용 절감 뿐만 아니라, 조직배양 식물체의 효율적인 순화방법 개발, 양구기술, 재배작형, 재배법 개발 등 포장 단계에서의 다각적인 기술 개발이 요구됨.
- 따라서 우량종구 생산체계의 확립되면 국내 마늘 생산농가 도움을 줄 뿐만 아니라, 관련 기술의 타 작목 확대에 기여할 것으로 전망됨

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용

1. 마늘 우량종묘의 기내급속 대량증식(충남대)

가. 마늘 우량종구 생산을 위한 경정배양 조건

1) 종구의 저온처리와 sucrose 농도의 효과

마늘 품종 ‘서산재래’를 2003년 8월 10일부터 4℃의 저온고에 넣어 1개월간 저온 저장한 저온처리구와 실내 상온에서 보관한 대조구로 구분하여 1-2개의 엽원기가 부착된 상태의 경정을 해부현미경하에서 절취하여 배양하였다. 배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962)기본 agar(0.8%)배지에 sucrose의 농도를 3%와 8%구의 두 가지 처리구로 구분하였다. 9월 9일부터 25℃ 및 16시간일장의 growth chamber에서 3개월간 배양한 후 생체중과 분화엽수를 비교하였다.

2) 종구의 저온처리와 배양시의 일장의 효과

종구의 저온처리는 실험1과 같은 조건으로 하였고, sucrose의 농도는 3%로 하였다. 일장은 장일(16/8)과 단일(8/16)조건으로 설정하여 25℃의 growth chamber에서 3개월간 배양한 후 생체중과 분화엽수를 비교하였다.

3) 종구의 저온처리와 성장조절물질의 영향

종구의 저온처리는 실험1과 같은 조건으로 하였고, sucrose의 농도는 3%로 하였다. 배지는 BA와 NAA의 무처리구(B0N0구)와 BA 2 + NAA 0.2mg · L⁻¹ 처리구(B2N0.2구)로 설정한 후 장일(16/8)과 25℃의 조건으로 3개월간 growth chamber에서 배양한 후 생체중과 분화엽수를 비교하였다.

4) 종구의 저온처리와 배양온도의 영향

본 실험은 실험1과 같은 조건에서 sucrose의 농도를 3%로 하고, 장일(16/8)의 조

건으로 3개월간 20 및 25℃의 growth chamber에서 배양한 후 생체중과 분화엽수를 비교하였다.

5) 최적배양조건의 조성

우선 실험 3의 LB2N0.2구에서 나타난 결함을 보완하기 위해서 NAA의 농도를 절반인 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 낮추고 배양온도를 20, 25, 및 28℃로 구분하여 경정을 배양하였다. 배지는 MS기본배지에 sucrose 3%, agar 0.8%를 첨가하고, 일장은 16/8시간의 장일조건으로 조성하였다.

6) 신초의 분지에서 일장의 효과

10월이 된 후 2개월간 저온을 경과한 종구를 재료로 하여 장일과 단일조건하에서의 분지의 효과를 검토하였다.

7) 종구의 저온저장기간에 따른 배양온도 및 일장처리 효과

저온 처리 기간에 따른 서산 마늘의 shoot, bulbs형성을 비교하기 위해서 2004년 7월에 수확한 서산 마늘을 4℃ 저온고에 각각 30, 40, 50, 60일 동안 저장하였다가 성장점 배양을 실시하였다. 성장점을 채취하기 위해 마늘의 뿌리와 인편 일부분을 깨끗하게 제거한 후 클린벤치 내에서 70% 알코올에 30초 동안 Table면 살균하고, 멸균수로 3회 세척하였다. NaOCl 20%로 15분간 소독한 다음 멸균수로 3회 세척하였다. 엽원기 1매를 포함하여 성장점을 떼어 배지위에 치상하였다. 배지는 성장조절물질을 첨가하지 않은 MS배지에 sucrose $30\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Phytigel $2.8\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 첨가하였으며 pH5.8에 고정하였다. 배양조건으로는 온도를 20℃와 25℃, 일장을 8시간과 16시간으로 하여 growth chamber 내에서 명배양으로 하였으며, 배양기간은 60일이었다.

8) Sucrose 농도와 성장조절물질 처리에 의한 shoot와 bulb형성의 비교

Sucrose 농도를 3%와 8%로 하여 성장조절물질을 첨가한 배지에 성장점을 배양하였으며, 배지별 성장점을 20개씩 치상하고 25℃, 16시간 일장 명배양을 하였다. 배지 내 성장조절물질의 농도는 대조구(성장조절물질 무첨가)와 BA 0.2 + NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, BA 1 + NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA 0.1 + Kinetin $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, BA 2 + NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 씩 첨가하였다. 치상 30일 후에 shoot와 bulb형성을 조사하였다.

9) 광질에 따른 shoot, bulbs형성의 비교

생장점 배양에 각각의 다른 광질의 효과를 알아보기 위해 적색광, 청색광, 보라색광으로 나누어 조사하였다. 배지 내 성장조절물질의 농도는 대조구(성장조절물질 무첨가)와 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹, BA 1 + NAA 0.1mg · L⁻¹, Kinetin 2 +NAA 0.2mg · L⁻¹씩 첨가하였다. 배양 조건은 25℃, 16시간 일장 명배양을 하였으며 배양기간은 60일이었다.

10) 성장조절물질이 첨가된 배지에서의 multiple-shoot 유도

고체 배지와 액체 배지의 형태에 따라 성장점의 변화와 shoot, bulbs 형성을 비교하기 위하여 각각 sucrose를 3%와 8% 첨가하고 성장조절물질 BA, NAA, kinetin을 혼합하였다. 성장점을 각각의 배지에 20개씩 치상하였으며, 25℃, 16시간 일장 명배양을 하였다. 배양 후 60일 후에 shoot, bulbs를 조사하였다.

전단계의 실험에서 sucrose 3%, 성장조절물질 BA 2 + NAA 0.02mg · L⁻¹첨가된 배지에서 shoot의 형성이 1.45개로 양호하였음을 토대로 MS배지에 첨가하는 cytokinin인 BA를 kinetin으로 교체하여 각각 1, 2, 4mg · L⁻¹의 농도로 처리하고 auxin으로는 IAA와 NAA를 각각 0.2mg · L⁻¹의 농도로 처리하였다. 성장점을 각각의 배지에 20개씩 치상하였으며, 25℃, 16시간 일장으로 배양 후 30일 경과한 시점에서 shoot의 분화와 bulb의 형성 정도를 조사하였다.

11) 2iP 와 kinetin 및 IAA 조합처리에 따른 생장 비교

2차 실험에서 얻은 결과에서 kinetin과 IAA를 조합처리한 배지와 2iP와 IAA의 농도별 조합처리에 따른 기관분화 및 증식효율에 미치는 영향을 알아보았다. 4℃ 저온창고에 40일간의 저온 처리한 서산 마늘의 성장점을 채취하기 위해 마늘의 뿌리와 인편 일부분을 깨끗하게 제거한 후 Clean bench 내에서 70% ethyl alcohol에 30초 동안 표면 살균하고, 멸균수로 3회 세척하였다. NaOCl 20%로 15분 소독한 다음 멸균수로 3회 세척하였다. 엽원기 1매를 포함하여 성장점을 떼어 배지위에 2개씩 20반복 처리하였다. 배지는 기본 MS(Murashige and Skoog, 1962)고체배지에 sucrose 3%, Phytigel 2.8g/L 첨가하였으며 pH 5.8에 고정하였다. 성장조절물질로는 kinetin 2.0mg · L⁻¹과 2iP(6-(dimethylallylamino)-purine)을 2.0, 4.0mg · L⁻¹와 IAA(indole

buric acid) $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 각각 조합하여 처리하였다. 배양조건으로 온도는 25°C , 일장은 16시간으로 하여 Growth Chamber 내에서 2개월 동안 배양하여 유식물체 분화수와 bulb 유도율을 조사하였다.

12) 총포배양에 의한 multiple-shoot 유도

충남 서산 마늘의 총포를 이용하여 BA와 NAA 및 2iP와 IAA 처리에 따른 기관분화 및 증식효율에 미치는 영향을 검토하였다. 총포를 채취하기 위해 마늘총포의 일부분을 깨끗하게 제거한 후 Clean bench 내에서 NaOCl 3%로 10분 침적살균한 다음 멸균수로 3회 세척하였다. 95% ethyl alcohol에 침지하여 화염소독한 후 총포에 주아 및 화아가 붙은 화탁을 0.1mm 부착된 상태로 4등분하여 각 배지위에 2개씩 20반복으로 치상하였다. 배지는 기본 MS고체배지에 sucrose 3%, Phytigel 2.8g/L 첨가하였으며 pH5.8에 고정하였다. 성장조절물질로는 전년도 충남농업기술원의 보고서 실험의 결과에 따른 BA(6-benzylaminopurine) $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 NAA(α -naphthalene acetic acid) $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 2iP를 각각 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 조합하여 처리하였다. 배양조건으로 온도는 25°C , 일장은 16시간으로 하여 Growth Chamber 내에서 2개월 동안 배양한 후 유식물체 덩어리에서 shoot 1개씩 떼어내어 2개월 배양한 후 3회에 걸쳐 각각 유식물체 분화수와 bulb 유도율을 조사하였다. 또한 조사 후 구 비대시키기 위하여 3L bioreactor를 이용하여 1.5L의 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS액체배지에 옮겨 45일 배양하여 bulb의 직경, 무게, 수량을 조사하였다.

13) 광도에 따른 shoot, bulbs형성의 비교

광의 세기가 마늘의 성장점 배양시 shoot의 발생 및 bulb의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 할로겐 램프와 3상에서 광을 조사해 줄 수 있는 growth chamber에서 25°C , 16시간 일장으로 배양하였다. 실험에 사용한 배지는 기본 MS고체배지에 sucrose 3%, phytigel $2.8 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 첨가하고 pH는 5.8에 고정하였으며 성장조절물질로는 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA를 복합처리하였다. 배양조건은 Growth Chamber 내에서 마늘의 성장점을 치상한 배양병을 놓은 위치별로 광도를 광도계로 측정된 결과 3상의 형광등과 할로겐 램프가 직접적으로 영향을 미치는 상위 부분은 250lm이었고 할로겐 램프에서 원거리에 있는, 3상의 형광등만이 영향을 미치는 하위 부분은 80lm이었다. 25°C , 16시간 일장으로 배양하여 각 처리당 2개

씩 20 반복으로 처리하여 유식물체 분화수와 bulb 유도율을 조사하였다. 또한 조사 후 구 비대시키기 위하여 3L bioreactor를 이용하여 1.5L의 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS 액체배지에 옮겨 45일 배양하여 multiple-bulb가 생산되는가도 관찰하였다.

나. Shoot-bud 이용한 생물반응기배양 시스템 개발

1) 성장조절물질의 효과

상기에서 언급한 몇 가지 장애요인을 해결하기 위하여 고체배지배양 보다 대형화의 가능성이 있는 생물반응기배양 시스템을 개발하여 실용화 하고자 하였다. 첫단계로 5L 배양기에 1L의 액체 배지를 넣었다.

배양할 재료로는 성장점을 절취한 후 MS기본 고체배지에서 20일간 예비배양한 재료를 용기 1개당 20개씩 옮겨 배양을 시작하였다. 배지의 종류로는 기본배지의 종류를 MS배지와 LS(Linsmyer and Skoog, 1965)배지의 두 종류로 하였다. 배지에 첨가한 성장조절물질의 조성으로, (A) MS, BA 0 + NAA 0mg · L⁻¹(0.8% agar 고체배지); (B), MS, BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹; (C), MS, BA 0 + NAA 0mg · L⁻¹; (D), LS, BA 2 + NAA 0.2mg · L⁻¹; (E), LS BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹; (F), LS, BA 0 + NAA 0mg · L⁻¹의 6 처리구를 설정하였다. 배양은 25 ± 3°C의 배양실에서 16/8의 장일조건으로 하였으며, 에어펌프를 이용한 하부공기주입방식을 채택하였다.

2) Bioreactor를 이용한 마늘 기내구 비대 및 성장 비교

성장점을 성장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에 치상하여 30일 후에 Bioreactor에 배양하였다. 배지에는 sucrose 농도를 3%, 8%, 11%하여 액체배지 형태로 하였다. 배양 후 90일 후에 구비대 정도 및 성장 정도를 조사하였다.

3) Tank배양을 이용한 기내구 형성 및 비대유도

성장점을 성장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에 치상하여 30일 후에 15L 시판용 탱크에 배양하였다. 탱크내 배지는 MS배지에 sucrose 8%를 첨가하고, 성장조절물질은 대조구와 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹, BA 0.2 + NAA 0.2mg · L⁻¹, BA 0.2 + NAA 2mg · L⁻¹를 각각 첨가하였다. 탱크의 배지의 약은 5L로 하였다. 배양 조

건은 25℃, 16시간 일장 명배양으로 하였으며 60일 후에 구비대 정도를 비교하였다.

4) multiple-shoot 유도배지에서의 multiple-bulb비대

2차 보고서 실험결과에서 얻어진 결과로부터 multiple-shoot를 유도하는 조건 kinetin $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이 비대 단계에서 처리할 경우 multiple-bulb를 생산해 낼 수 있는가를 알아보기 위하여 실험하였다. 기본 MS고체배지에 성장조절물질 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA를 복합처리하고 2개월 동안 성장점 배양하여 shoot 및 bulb를 유도하여 재료로 준비하였다. 구비대 시키는 배지는 기본 MS액체배지에 sucrose 3%를 첨가하고 pH는 5.8에 고정하였으며 kinetin $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가하였다. 재료 20개체를 1.5L의 액체배지를 넣은 3L bioreactor로 옮기고 45일 배양하여 bulb를 생산하였다.

5) Tank배양시 이식하는 shoot와 bulb의 수에 따른 구비대 효과

구비대단계에서의 shoot 및 bulb의 개수가 bulb 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS고체배지에 성장조절물질 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA를 복합처리하고 2개월 배양하여 유도된 shoot 및 bulb를 각각 1, 3, 5개씩 한개체가 되도록 처리하여 실험하였다. 각 처리당 30개체씩 10L 시판용 tank에 옮겨 배양하였다. Tank내 배지는 기본 MS액체배지에 sucrose 3%를 첨가하고 pH는 5.8에 고정하였으며 배지의 양은 2L로 하였다. 배양 조건은 25℃, 16시간 일장으로하여 45일 후에 생산되는 bulb의 직경, 무게를 조사하였다.

6) multiple-shoot 유도배지와 CCC 첨가에서의 구비대

2차 보고서 실험 결과에서 multiple-shoot 유도에 있어서 양호하였던 $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 kinetin과 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA의 복합처리가 실험 (2)-1의 결과에 의하면 구비대 시키는 데는 효과가 인정되지 않아 kinetin의 농도를 줄여 첨가하고 IAA를 대신하여 구비대 촉진효과가 있는 CCC를 처리하였다. 또한 본 실험 결과에서 multiple-shoot 유도에 있어서 양호하였던 유도조건과 CCC의 단독처리가 생산된 multiple-bulb의 비대에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 실험하였다. Sucrose 3%를 첨가한 기본 MS고체배지에 성장조절물질 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA를 복합처리

하고 2 개월 배양하여 유도된 shoot 및 bulb를 3개씩 한개체가 되도록하여 각 처리당 30개체씩 10L 시판용 tank에 옮겨 배양하였다. Tank내 액체배지는 기본 MS, kinetin $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 CCC를 $700\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 복합처리, $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA 복합처리, CCC $700\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 단독처리로 4처리구로 하였으며 모든 배지는 sucrose 3%를 첨가하고 pH는 5.8에 고정하였으며 배지의 양은 2L로 하였다. 배양 조건은 25°C , 16시간 일장으로하여 45일 후에 생산되는 bulb의 직경, 무게를 조사하였다.

7) Sucrose 농도차에 따른 마늘 구비대 실험

비대과정인 tank 액체배양시 기내구의 형성과 비대에 당의 급원으로서 sucrose 농도가 bulb의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험하였다. Sucrose 3%를 첨가한 기본MS고체배지에 2iP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 첨가한 배지에서 성장점을 2 개월 동안 배양하여 multiple-shoot를 유도한 후 3개씩 한 덩어리가 되도록 shoot를 잘라 재료로 준비하였다. 구비대시키기 위한 조건으로 10L 시판용 Tank에 sucrose 농도를 3%와 8%로 각각 첨가하고 pH는 5.8에 고정하였다. 처리당 30개체씩 기본 MS액체배지에 옮기고 25°C , 16시간 일장으로 하여 광의 효율을 높이기 위해 배양대에 알루미늄 호일을 깔고 배양하였다. 45일간 배양한 후에 bulb의 직경, 무게를 조사하였다.

8) 성장점 배양기간 중 성장조절물질의 첨가에 따른 구비대

마늘의 초기 성장점 배양시 성장조절물질의 처리가 구비대에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험하였다. 실험에 사용한 모든 배지는 sucrose 3%를 첨가하고 pH는 5.8에 고정하였다. 기본 MS고체배지와 2iP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 첨가한 각각의 배지에서 성장점을 2 개월 동안 배양한 후 tank로 옮겨 기본 MS액체배지에서 25°C , 16시간 일장으로 45일동안 배양한 후에 bulb의 직경, 무게를 조사하였다.

9) 액체 tank배양을 통한 multiple-bulb 생산

이전까지의 각 실험에서 얻어진 효과적인 결과를 토대로 하여 구비대 실험을 하였다. 마늘의 성장점을 기본 MS고체배지에 multiple-shoot 유도조건인 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA를 처리하고 성장점을 치상하여 2 개월동안 배양하여

multiple-shoot 유도한 후 3개씩 한개체가 되도록 실험재료로 준비하였다. 구비대 시키기 위한 과정으로써 기본 MS 액체배지와 2차 보고서의 결과에서 양호하였던 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 BA와 $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 NAA를 복합처리하였고, 세포분열을 촉진하는 효과가 있는 ascorbic acid $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 단독처리하였다. 실험에 사용한 모든 배지는 sucrose 3%를 첨가하고 pH는 5.8에 고정하였다. 10L 시판용 Tank에 재료를 옮기고 각각 25°C , 16시간 일장으로 45일간 배양하여 bulb의 직경과 구중, 건조시킨 후의 직경, 구중, 수량을 조사하였다.

10) 기내배양형성 소인경구의 포장적응성

2차 보고서 실험에서 생산된 muliti-bulb와 본 실험 (2)-3에서 생산된 muliti-bulb를 하나씩 떼어내어 저온 저장한 단구를 혼합상토인 '바로커상토'를 이용하여 $558 * 140 * 158$ 규격의 flower box에 가식하고 포장적응성을 검토하였다. 2차 실험에서 생산된 단구는 건조시킨 후 직경을 측정하여 0.5~1.0, 1.0~1.5cm의 크기의 단구를 예비 실험으로써 flower box당 10개씩 2005년 10월에 파종하여 2006년 6월에 수확하였고, 본 실험에서 생산된 단구는 건조시킨 후 무게를 측정하여 0~0.2 g 미만, 0.2~0.4 g 미만, 0.4~0.6 g 미만 크기의 단구를 flower box당 10개씩 3반복으로 2006년 3월 파종하여 현재 생육이 진행 중에 있다.

2. 마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급체계 확립(충남농업기술원)

가. 총포배양 유래 유식물체 순화를 위한 온실 재배조건 구명

1) 차광정도에 따른 생육

기내에서 생산된 유식물체의 순화를 위한 적정 차광조건을 구명하기 위하여 판매되는 차광막을 이용 55%, 75%, 95% 차광 처리하였다. 기내 생산된 유식물체를 재료로 하여 깨끗이 세척 후 지상부로부터 2cm까지만 남겨놓고 윗 부위는 절단한 다음, 시판되는 혼합상토인 '바로커상토'가 들어있는 32공 트레이 폿트에 가식하고 생존율, 도복율, 초장, 엽수 등을 조사하였다.

2) 적정상토 선발

시험 1)에서 생산된 균일한 식물체를 32공 트레이 포트에 시판용 상토(바로커상토)와 peatmoss + vermiculite + perlite(30 : 40 : 30), peatmoss + vermiculite(50%:50%), peatmoss + vermiculite(35 : 75), peatmoss + 황토(50 : 50))로 조제, 사용하였다.

나. 마늘 총포배양에 의한 유식물체 대량증식

실험 재료로 충남 서산지역에서 많이 재배하고 있는 한지형 마늘인 서산 재래종의 총포를 이용하여 총포배양시 BA와 NAA 처리농도에 따른 기관분화 및 증식효율에 미치는 영향을 검토하였다.

총포를 채취한 후 3% sodium hypochlorite 용액에 5~10분간 침지 살균한 다음 멸균수로 3회 세척하고, 이것을 clean bench 내에서 95% ethyl alcohol에 침지하여 화염 소독한 후 총포에 주아 및 화아가 붙은 화탁 0.1mm 부착된 상태로 4등분하여 각 처리별로 배양하였다.

배지는 sucrose 3%가 첨가된 MS(Murashige and Skoog, 1962)기본배지로 하여 성장조절물질과 sucrose 3%를 첨가하고 pH 5.7로 조절한 후 125mL 삼각플라스크 20mL씩 분주한 다음, 121℃에서 15분간 고압살균 하였다.

첨가된 성장조절물질로는 BA(6-benzylaminopurine) 0.5, 1.0mg · L⁻¹와 NAA (α -naphthaleneacetic acid) 0.1, 0.5, 1.0mg · L⁻¹를 복합 처리하였으며, 22±2℃에서 16시간 일장, 2,500Lux, 80rpm으로 30일간 액체배양한 후 생존율, shoot 분화율 등을 조사하였다.

BA와 NAA 처리농도별 총포배양에서 얻어진 유식물체 덩어리를 shoot 1개 이상 포함시킨 절편상태로 MS 배지에 1개월간 계대배양한 다음, 유식물체 분화수와 callus 형성정도, 발근정도를 조사하였다.

다. 총포 유식물체에서 형성된 단구 포장 적응성 검토

총포배양에 의해 생산된 총포 단구를 3.5g이상, 1.6~3.4g, 1.5g이하로 구분하여 크기에 따른 초장, 엽수, 경경의 생육상태를 파종후 180일 후에 조사하였다.

라. 기내배양 유식물체 순화 조건 구명

1) 적정상토 선발

총포배양에 의해 생산된 균일한 식물체를 32공 트레이 포트에 원예용상토, 원예용상토50% : 펠라이트50%(1:1), 피트모스30% : 질석20% : 펠라이트30% : 발흙20%, 피트모스30% : 질석40% : 펠라이트30%, 피트모스30% : 질석20% : 펠라이트30% : 발흙15% : 활성탄 5%로 하여 혼합하여 유식물체 순화 용토로 사용하였다. 조사는 순화 45일후의 생존율, 초장, 엽수, 엽중, 건물중 등을 하였다.

마. 기내자구 저장조건에 따른 생육 및 수량성 비교

저장에 이용한 기내자구는 3g이상 되는 구를 선별하여 저장시험에 이용하였고, 온도처리는 4℃, 7℃, 10℃ 3처리로 저장기간은 30일로 하였다. 저장은 기내자구를 육묘상자에 담아서 저장을 하였다. 정식 시 복토는 종자두께의 3배 정도의 두께가 되도록 하였고, 기타 재배는 표준 재배에 준하였다. 지상부 생육은 수확 30일 전에 하였고 출현기, 출현율, 초장, 엽수를 조사하였다.

바. 무병종구 년차별 바이러스 이병율 조사

마늘에 피해를 준다고 알려져 있는 OYDV(onion yellow dwarf virus), potyvirus group, TMV(tobacco mosaic virus)를 Agdia사의 ELISA test kit를 이용하여 바이러스 감염여부를 조사하였다. 조직배양 소구, 단구 및 인편을 비가림 하우스에 파종하여 각각 생육중인 개체의 엽육조직을 5월 상순에 채취하여 5개체를 1반복으로 하여 3반복으로 주어진 매뉴얼에 따라 수행하고, Bio-Rad사의 microplate reader을 이용하여 측정하였다.

제 2 절 연구결과 및 고찰

1. 마늘 우량종묘의 기내급속 대량증식(충남대)

가. 마늘 우량종구 생산을 위한 경정배양 조건

1) 종구의 저온처리와 Sucrose의 효과

경정배양의 결과는 Fig. 1에서와 같이 생체중이나 엽수 모두 저온처리한 처리구가 대조구인 실온 저장구에 비해 양호하였다. 특히 실온저장구의 경정을 sucrose 8% 배지에서 배양할 경우 생체중이나 분화엽수의 수가 현저히 낮아 가장 불량한 결과를 보였으며, 반면에 저온처리구의 8% sucrose 배양구에서는 엽구의 분화가 현저하게 많았다. 그러나 생체중에 있어서는 저온처리의 효과는 인정되었으나 sucrose 농도간의 차이는 보이지 않았다. 이 실험에 있어 분구의 형성이나 분주에 관한 결과는 보이지 않았다.

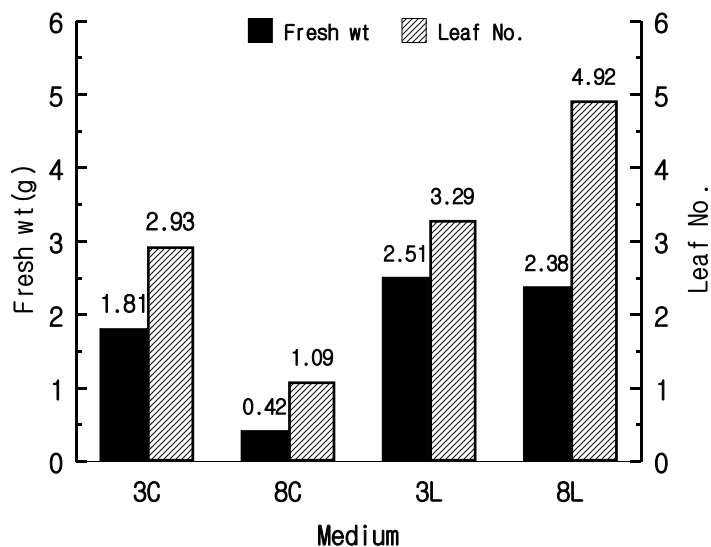


Fig. 1. 마늘의 경정배양에서 종구의 저온처리(C, room temp.; L, 4°C)와 sucrose 농도(3%, 8%)의 효과

2) 종구의 저온처리와 배양시의 일장의 효과

배양의 결과는 Fig. 2에서와 같이 생체중에 있어서는 일장에 관계없이 저온처리구에서 효과가 양호하였고 저온처리구 내에서는 16/8의 장일하에서 다소 양호하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았으나, 실온저장구에서의 생체중은 단일조건에서 장일조건에서 보다 매우 저조한 결과를 보이고 있다. 분화된 엽수의 경우에 있어서는 저온처리-장일구에서 가장 양호하였고 다음으로는 실온저장-장일구에서 양호한 것으로 나타나 앞의 분화에는 장일의 효과가 있는 것으로 보였다.

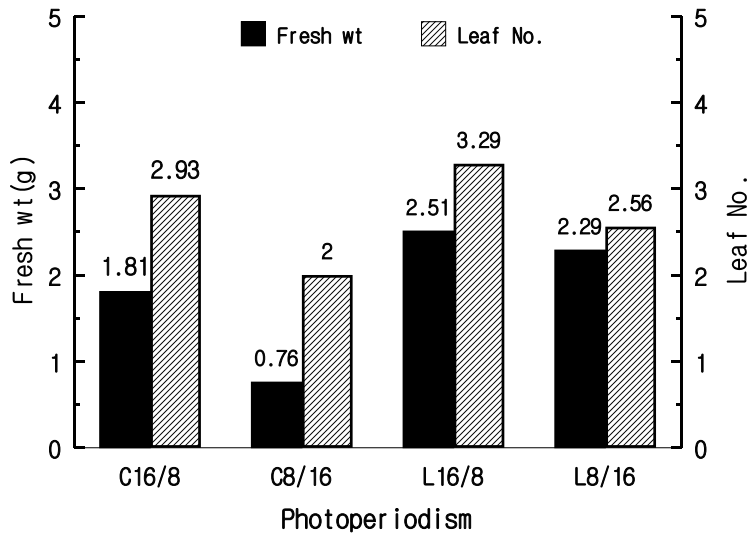


Fig. 2. 마늘의 경정배양에서 종구의 저온처리와 배양시 일장의 영향

3) 종구의 저온처리와 성장조절물질의 영향

본 실험은 실험1과 같은 조건에서 sucrose의 농도를 3%로 하고, 성장조절물질처리로 BA 와 NAA 각 $0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 무처리구(B0N0구)와 BA 와 NAA 각 $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 처리구(B2N0.2구)로 설정한 후 장일(16/8)과 25°C 의 조건으로 9월 9일부

터 3개월간 growth chamber에서 배양한 후 생체중과 분화엽수를 비교하였다.

배양의 결과는 Fig. 3에서와 같이 생체중에 있어서는 저온처리한 후 B2N0.2구 (LB2N0.2)에서 배양하였을 때 가장 높은 수치를 보였다. 다음은 저온처리한 후 B0N0구(LB0N0)에서 배양하였을 때로서 역시 저온처리의 효과가 인정되었고, Fig. 4

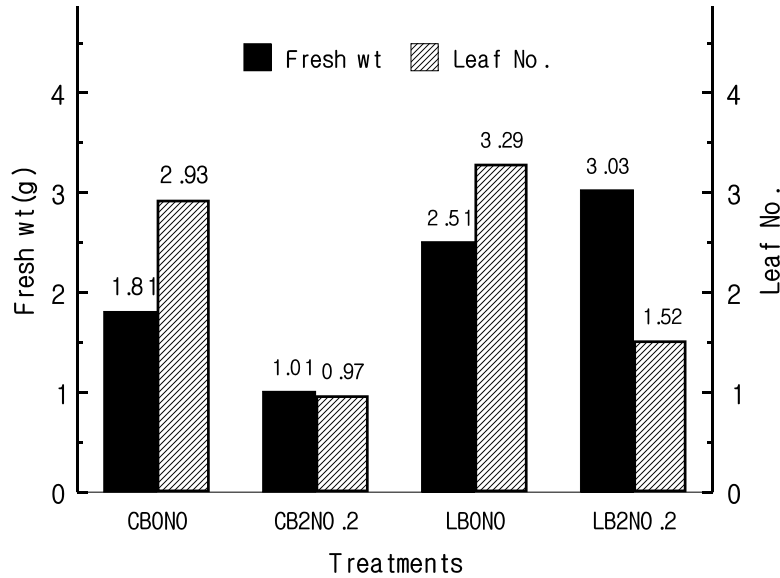


Fig. 3. 마늘의 경정배양에서 종구의 저온처리와 성장조절물질의 효과

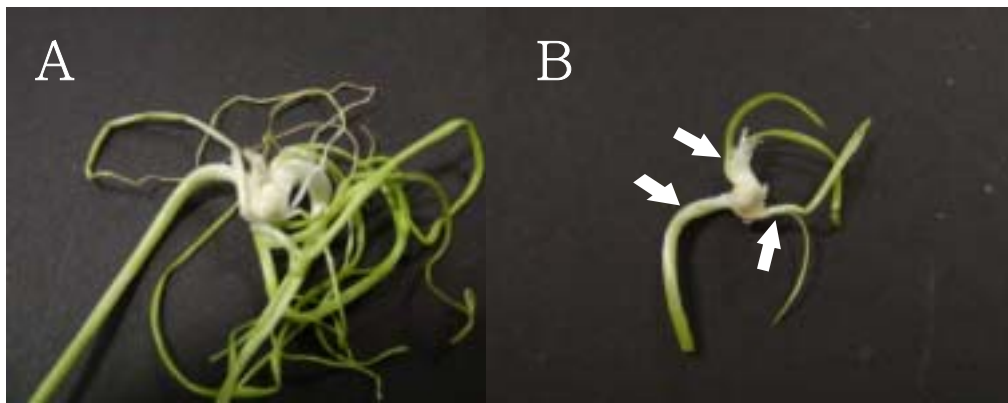


Fig. 4. BA 2.0 및 NAA 0.2mg · L⁻¹가 첨가된 MS배지에서 생육한 식물체의 모습 (A)와 이 식물체의 분주형상(B) (25°C, 1/30-4/24).

에서와 같이 LB2N0.2에서 배양되고 있는 신탄는 분주가 되고 있음을 보이고 있다. 그러나 이 경우의 생장조절물질의 처리에 있어서도 상온저장의 종구에서 경정을 채취하여 배양할 경우에는 발육이 부진함을 알 수 있다. 다만 LB2N0.2구의 경우 분화엽의 형태가 실처럼 도장성이거나 발육이 비정상인 개체들이 많이 나타나고 있어 Fig. 3에서와 같이 생체중의 증가나 Fig. 4에서와 같이 분주가 보였음에도 불구하고 평균 분화엽수는 작게 나타나고 있었다.

4) 종구의 저온처리와 배양온도의 영향

본 실험은 실험 1)과 같은 조건에서 sucrose의 농도를 3%로 하고, 장일(16/8)의 조건으로 9월 9일부터 3개월간 20 및 25℃의 growth chamber에서 배양한 후 생체중과 분화엽수를 비교하였다.

배양의 결과는 Fig. 5에서와 같이 생체중에 있어서는 저온처리구의 20℃구(L20) 배양에서 가장 효과가 좋았고 다음은 저온처리구 25℃구(L25), 상온저장구의 20℃구(C20)의 순이었으나 L25구와 C20구의 차이는 크지 않았다. 특히 엽수의 분화는 L20구와 C20구간의 차이가 보이지 않았던 반면 L25구에서는 뚜렷하게 감소는 경향을 보였다.

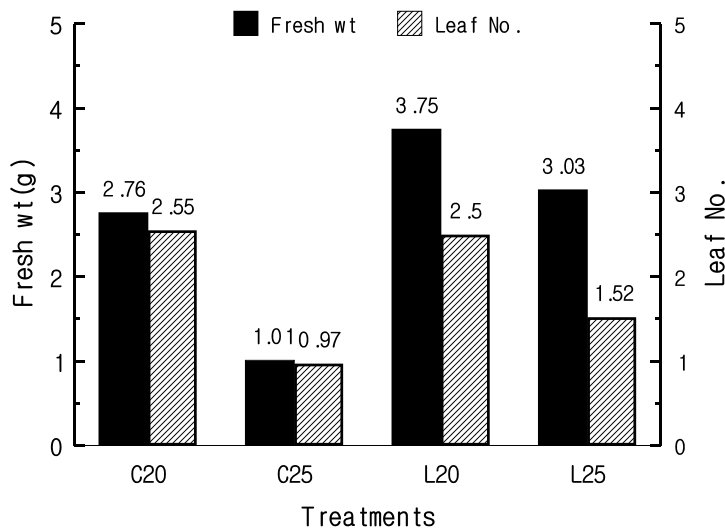


Fig. 5. 마늘의 경정배양에서 종구의 저온처리와 배양온도의 영향

마늘은 수확 후 휴면상태로 존재하고, 성장점배양에서는 휴면기에 있어도 생육은 어느 정도 가능하지만 역시 1개월 이상의 휴면타과를 위한 저온처리를 실시함으로써 경정의 발달을 촉진시킬 수 있었다고 판단된다. 그러나 마늘의 휴면은 수확 후 2개월 정도의 저온조우에 의해 휴면은 타과되는 것으로 지속적인 저온처리의 필요성은 요구되지 않는 것으로 알려져 있다.

마늘의 배양에서 중요한 사항으로는 ① 건전한 다신초의 발육, ② 분주, ③ 인경구의 형성의 3단계 생장이 균형있게 이루어져야한다. 실험 1), 2), 3)의 결과에서 마늘의 경정배양에서 ① 단계에서의 저온처리의 효과가 뚜렷하게 인정되었다. 따라서 ② 단계, ③ 단계로의 연구의 진전이 요구된다.

이전의 연구에서 분주의 유도에 있어서는 성장조절물질의 처리로 가능하다는 결론하에 건전한 생육과 소인경구의 생산이 가능한 조건을 파악하고자 다음 단계의 연구를 수행하였다.

5) 배지 조성의 최적화

우선 실험 3)에서의 LB2N0.2구에서의 결함을 보완하기 위해서 NAA의 농도를 절반인 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 낮추고 배양온도를 20, 25, 및 28°C 로 구분하여 경정을 배양하였다. 배지는 MS기본배지에 sucrose 3%, agar 0.8%를 첨가하고, 일장은 16/8시간의 장일조건으로 조성하였다.

3개월간의 배양결과, Fig. 6에서와 같이 온도에 따라 각기 다른 양상을 보이고 있다. 20°C 에서는 경정으로부터 외대의 신초가 분화하여 외견상 생육이 가장 정상적으로 생육되고 있는 것으로 보이지만 오히려 25°C 구에서 분주의 가능성이 보이고 있다. 그러나 28°C 와 같이 비교적 고온에서는 NAA의 농도가 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 인데도 기부조직이 캘러스로 탈분화되는 초기단계를 보임으로써 정상적인 식물 개체로 발달하기 어려운 양상을 보이고 있었다.

다음으로 일장시간을 다르게 한 경우를 비교할 때 Fig. 7에서와 같이 비슷한 장일조건인 16/8의 장일이나 14/10의 장일조건 간에는 큰 차이를 보이지 않는 듯 했다.

다음 단계로 성장조절물질의 농도를 더욱 낮추어 BA의 농도를 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 하고 NAA의 농도를 $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 하여 대조구(A구), BA 0.2 + NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 구(B구) 및 BA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 단독처리구(C구)를 설정하여 배양한 결과, Fig. 8에서와 같이 다신초의 분화나 잎의 분화에서 B구에서의 가능성과 또한 소인경구 분화의 가

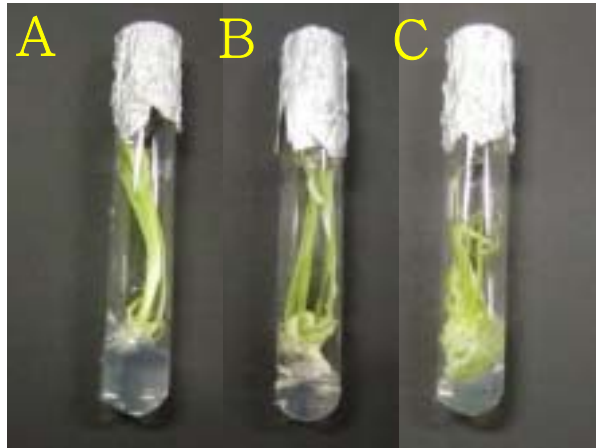


Fig. 6. 마늘의 경정을 BA 2 및 NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 MS배지에서 16/8 일장으로 배양할 때 배양온도의 영향(A, 20; B, 25; C, 28°C)

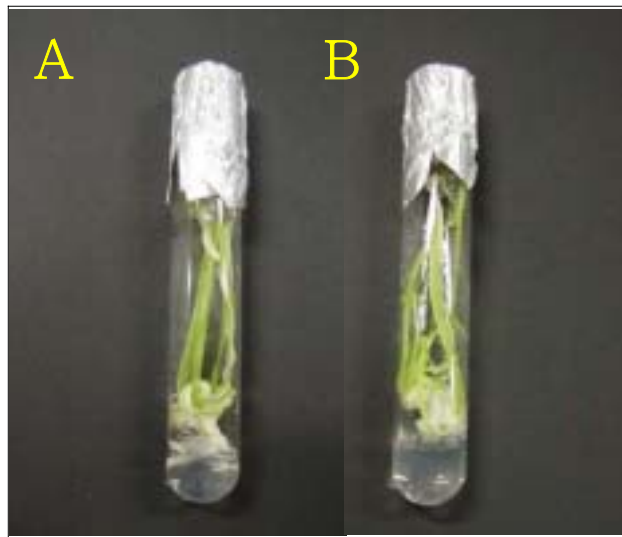


Fig. 7. 마늘의 경정을 BA 2 및 NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 MS배지에서 25°C로 배양할 때 장일의 효과(A, 16/8; B, 14/10의 일장)

능성도 인지되었다.

일반 토양재배에서의 마늘의 분구는 저온에 의해 종구의 성장점이 화아로 분화된 후 액아가 분화되고 분화된 액아가 주로 장일조건의 영향을 받아 인편으로 분화하면서 이로 인해 여러 쪽의 마늘이 형성되는 것이다. 그러나 기내배양에 있어서는 저온 처리에 의한 화아분화의 유도과 이에 따르는 액아의 분화를 유도하는 것 보다는 생장조절물질의 처리에 의존하는 편이 여러 면에서 유리하다. 다만 무리한 생장조절물질의 사용은 변이의 유발을 초래하는 경우가 많다. 그러나 마늘이나 백합과 같은 백합과식물의 경우는 이러한 경우에도 변이가 쉽게 유발되지 않고 혹시 변이가 나타나도 빠른 기간 내에 회복되는 비교적 유리한 대상 식물이다. 그렇다 해도 생장조절물질을 가급적 줄이고도 효과를 상승시킬 수 있는 방법의 개발이 보다 바람직하다고 판단된다.

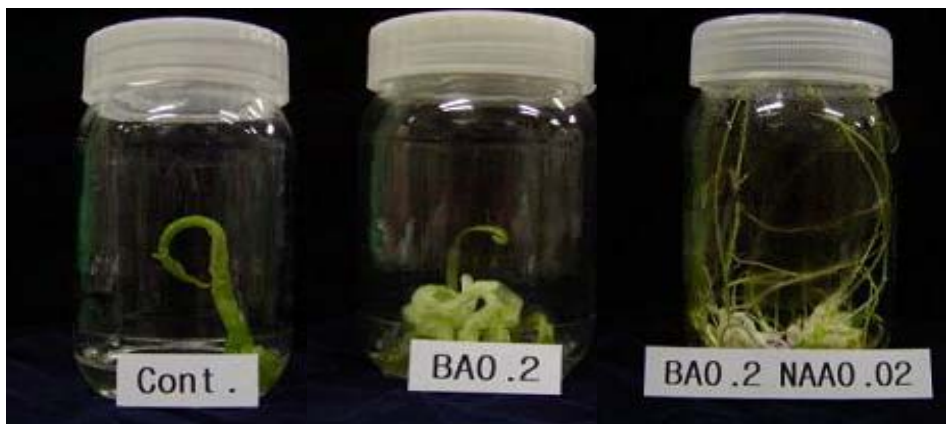


Fig. 8. 마늘의 경정을 MS배지에서 25℃의 온도로 배양할 때 배지에 첨가된 생장조절물질의 효과

6) 신초의 분지에서 일장의 효과

10월이 된 후 2개월간 저온을 경과한 종구를 재료로 하여 장일과 단일조건하에서의 분지의 효과를 검토하였다.

배양 2개월이 경과된 후의 결과는 Fig. 9에서와 같이 생체중이나 분지의 효과가 장일조건 하에서 뚜렷하게 나타났다. 특히 2.69개의 분지는 마늘의 성장점배양에서는 매우 높은 수치로 설명할 수 있는 바람직한 결과라고 판단된다.

이상의 결과들로부터 마늘의 경정배양에서 생육, 분지, 인경구를 형성하는 3단계에 관한 연구를 수행하였던 바 단순 기초연구의 방향으로서는 기틀을 잡을 수 있었다고 판단되지만, 실제 농가 보급을 목표로 할 경우에는 더욱 해결해야 할 문제점들도 도출하였다. 특히 배양기간이 3개월 이상 소요되면서도 목적하는 소인경구의 비대가 매우 지연된다 것과 용기나 배양의 형태에서도 고체배지를 사용할 경우 대량생산이 용이하지 않다는 것이 사실이고, 이는 실용화에 있어서 시간적으로 경제적으로 큰 장애요인으로 작용할 수 있다는 생각이 든다. 따라서 시간적으로나 장소적으로나 효율성에 있어서나 경제적인 방법의 도입에 관한 연구가 수반되어야 한다고 판단되므로 다음단계의 방법으로 전환하도록 하였다.

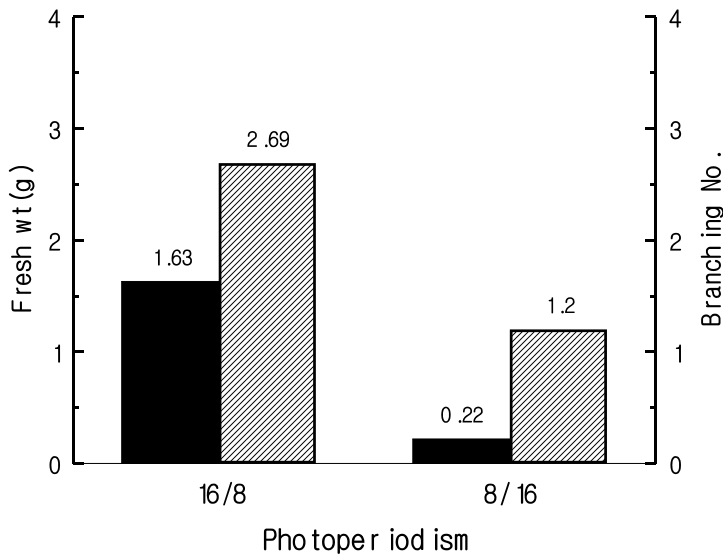


Fig. 9. 마늘의 경정배양에서 신초의 생육과 분지에 미치는 일장의 영향

7) 종구의 저온저장기간에 따른 배양온도 및 일장처리 효과

서산 마늘을 수확 후 4℃ 저온에서 각각 30, 40, 50, 60일 동안 저장한 후 성장점을 절취하여 성장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에 치상하여 배양하였다. 배양조건으로 온도는 20℃와 25℃의 두 처리구를 설정하였고, 일장은 8시간의 단일과 16시간의 장일조건으로 배양하였다.

4℃ 저온 저장의 결과 30일 처리는 shoot, bulb 발생률이 저조한 반면 40일 저장 처리 이상이 되면 shoot, bulb 발생이 현저히 좋아졌다. 마늘은 일반적으로 저온상태를 거쳐 일장효과하에서 배양해야 비로소 성장점이 비대한다는 것으로 알려져 있다. 생존률은 물론 shoot, bulb 형성이 매우 낮았다.

4℃에서 30일 동안 저온저장을 거친 마늘의 성장점을 채취하여 배양하였을 경우 Fig. 10에서와 같이 전반적으로 shoot의 출현율이 매우 저조한 편이었다. 다만 20℃에 8시간의 단일조건에서 0.35개의 shoot가 출현해서 0.2개의 bulb가 형성되었다. 이는 마늘의 경우 수확 후 휴면에 돌입하는 관계로 성장점의 생육 또한 저조한 것으로 판단되지만 30일 정도의 저온처리에 의해서는 휴면이 완전히 타파되지 않는 것이 원인으로 작용하여 성장점배양에서도 shoot의 발육이 부진한 것으로 판단할 수 있다.

그러나 40일간 저온처리한 종구의 경우 Fig. 11에서와 같이 4처리구에서 모두 30일간 저온처리한 구 보다 shoot의 발생이나 구형성에 양호한 결과를 보이고 있다. 이 처리구에서도 30일간의 저온처리구에서와 같이 20℃, 8시간 단일처리구에서 shoot와 bulb 발생 및 bulb의 형성이 각각 1.90 와 0.80 으로 가장 양호한 결과를 보여 주었고, 다음으로 25℃ 및 8시간의 단일처리구에서도 1.7개의 shoot가 발생하여 단일의 효과를 보여 주고 있다.

50일간의 저온처리구의 경우에는 Fig. 12에서 보여 주듯이 20℃ 및 16시간 장일의 배양조건에서 2.25개의 shoot가 발생하였으며 bulb의 형성도 0.85로 가장 양호하였다.

따라서 종구의 저온저장 기간이 40일 이상으로 늘어나면서 치상한 성장점의 생존이나 shoot의 발생율이 증가하였으며 bulb의 형성에도 효과적임을 알 수 있었으며 배양조건으로는 저온의 효과가 인정되었다. 그러나 전반적으로 저장기간이 40일이 경과한 후에는 큰 차이가 없었으나 저장 기간이 점차 길어질수록 배양 온도와 일장이 높아지는 양상을 발견하였다. 즉 30일간 저장의 경우 20℃/8광에서 shoot와 bulb의 발생이 가장 양호하였으나 40일간의 저장에서는 20℃/8시간 단일, 50일 저장에서

는 20℃/16시간 장일, 60일의 경우(Fig. 13) 25℃/16시간 장일처리에서 shoot와 bulb의 발생이 가장 양호하게 나타남을 알 수 있다.

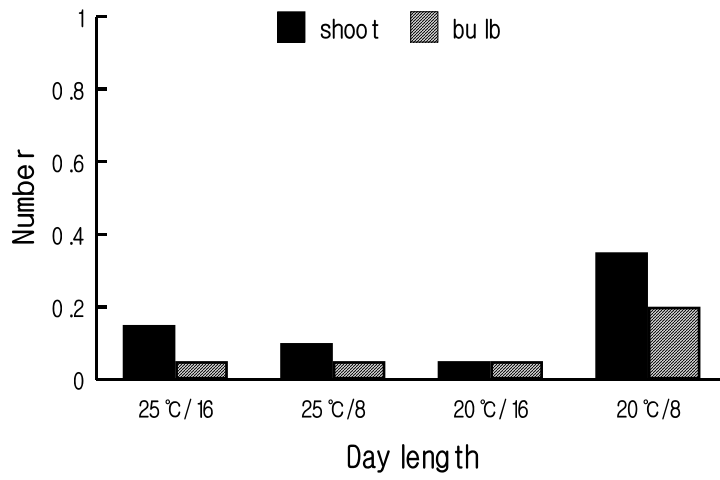


Fig. 10. 30일간 저온저장 마늘의 성장점배양에서의 배양온도와 일장에 따른 shoot의 발생 및 bulb의 형성

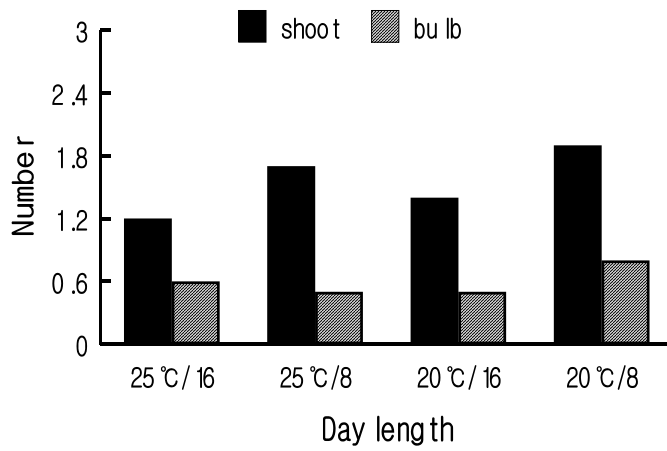


Fig. 11. 40일간 저온저장 마늘의 성장점배양에서의 배양온도와 일장에 따른 shoot의 발생 및 bulb의 형성

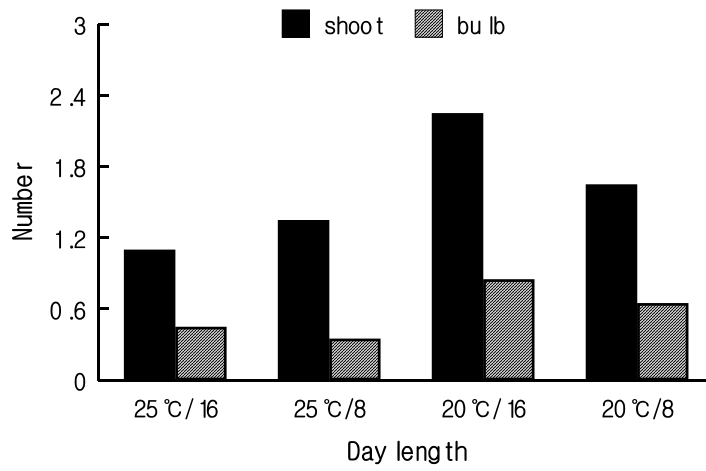


Fig. 12. 50일간 저온저장 마늘의 성장점배양에서의 배양온도와 일장에 따른 shoot의 발생 및 bulb의 형성

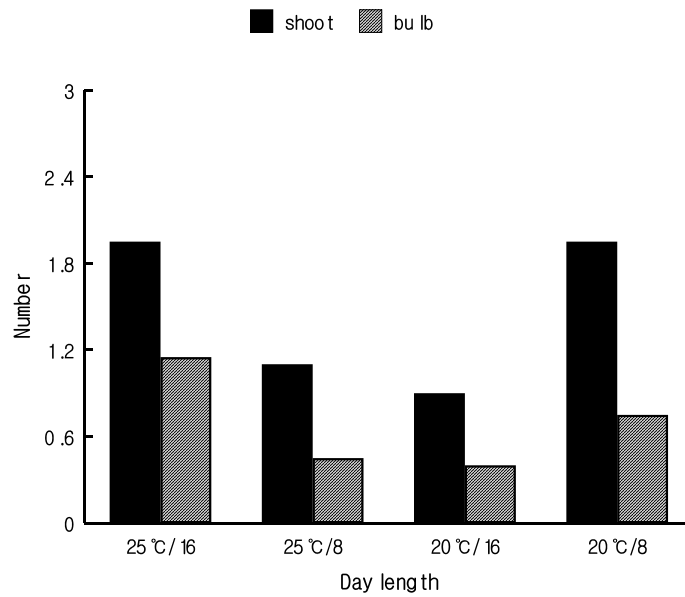


Fig. 13. 60일간 저온저장 마늘의 성장점배양에서의 배양온도와 일장에 따른 shoot의 발생 및 bulb의 형성

8) Sucrose 농도 차에 의한 shoot, bulbs 비교

마늘의 성장점배양에서 MS배지의 sucrose 농도를 3%와 8%로 설정하여 성장점을 치상하여 배양하였으며, 배양 조건은 25℃, 16시간 일장으로 하였다. 성장점 치상 후 30일간 배양한 후에 shoot의 분화와 bulb형성을 조사하였다.

성장점 배양에서 당은 식물체의 전분축적을 위한 중요한 탄수화물 급원이기 때문에 shoot형성과 bulb의 비대에 필수적인 요소라 할 수 있으므로 특히 기내구의 형성과 비대에 당의 급원으로서 sucrose 농도에 따른 효과를 비교하였다.

본 실험에서의 sucrose 농도에 의한 차이는 30일간의 배양초기단계에서의 결과로서, Fig. 14에서와 같이 성장점배양에서의 shoot 발생이나 기내구 형성 모두 sucrose 3% 첨가배지에서 8% 첨가배지보다 양호하여 3%의 sucrose농도에서 shoot 발생은 1.9개고, bulb의 형성은 0.9개였다. 반면 8%의 sucrose농도에서는 shoot 발생은 1.0에 bulb의 형성은 0.3으로 많은 차이를 보이고 있다. 따라서 마늘의 성장점배양에서 저농도의 sucrose농도가 shoot의 발생이나 bulb의 형성을 촉진시킴을 알 수 있으며, 이는 이것은 성장점을 배지에 치상한 후 성장점의 초기생장과과정에서의 배지의 삼투압 차에 의한 것으로 간주할 수도 있으나 기내구의 형성과정 다음 단계인 비대과정에서의 효과도 더 검토할 필요가 있고 이에 관한 실험은 계속 수행되고 있다.

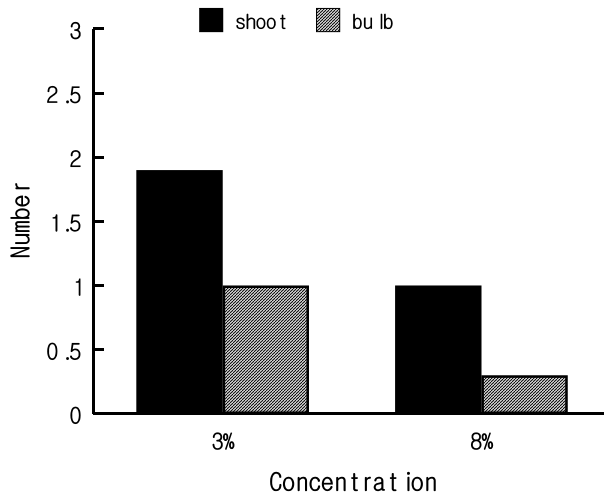


Fig. 14. 마늘의 성장점배양시 배지의 sucrose 농도에 따른 shoot의 발생 및 bulb형성에 미치는 영향

9) 광질에 따른 shoot의 발생 및 bulbs형성의 비교

광질의 효과를 알아보기 위해 적색광, 청색광, 근적외선광으로 나누어 Growth chamber 내에서 생장점을 배양한 배양하였다. 각각의 광질의 효과를 내기 위해 셀룰로판지를 준비하였으며 60*80*20cm 규격을 만들어 growth chamber에서 60일 동안 배양하였다.

동시에 실험 8)에서와 같이 sucrose 농도를 3%와 8%로 설정하여 60일간 배양한 결과 Fig. 15에서와 같이 3% sucrose배지의 경우 Farred구에서 다른 처리구에 비해 shoot의 분화나 bulb의 형성에 다소 양호한 경향을 보이고 있으나 큰 차이는 인정되지 않았다. 그러나 8% sucrose배지의 경우에는 3% sucrose 배지에서와는 다르게 광질에 따른 차이가 뚜렷하여 적색광하에서 효과가 높아 shoot의 분화는 1.35, bulb의 형성은 0.85이었고, 다음으로는 청색광구로 shoot의 분화는 1.05, bulb의 형성은 0.65의 결과를 보이고 있으나 근적외선 하에서는 3% sucrose배지에서와 같은 결과를 보이고 있어 마늘의 생장점배양에서 광질의 조건이 shoot의 분화나 기내 인경구의 형성에 어떠한 작용을 하고 있음을 보여 주고 있다.

광질에 의한 영향에 관한 실험을 수행하면서 동시에 배지에 첨가되는 생장조절물질의 영향을 비교 검토하였다. 배지에 첨가한 생장조절물질로는 cytokinin으로 BA와 kinetin을 auxin으로 NAA를 이용하였다. 생장조절물질의 처리 농도는 1차년도에서 수행되었던 결과를 근거로 하여 대조구로 A구를 두었고, B구에는 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹, C구에는 BA 1 + NAA 0.1mg · L⁻¹, D구로는 kinetin 2 +NAA 0.2mg · L⁻¹를 첨가하여 생장점배양을 수행하였다.

배양 후 60일이 경과하였을 때의 생장점배양에서의 shoot 발생과 bulb 형성을 비교한 결과, 적색광하에서는 Fig. 16에서와 같이 3% sucrose배지에서는 BA처리에 의해 shoot의 분화가 양호하였고, kinetin과 NAA를 처리한 D구에서 저조한 결과를 보였으며 기내구의 형성은 바람직하지 않은 결과를 보이고 있었다. 특히 청색광하에서의 B구에서 shoot의 발생이나 bulb의 형성이 매우 양호하였으며 C구나 D구에서는 광질의 영향을 크게 받지 않았음을 보이고 있다.

그러나 sucrose 8%가 첨가된 배지에서의 shoot 발생과 bulb형성에 관한 결과는 sucrose 3%배지에서와 전체적으로 다른 결과를 보이고 있다. 즉 Fig. 17에서와 같이 sucrose 3%배지에서 가장 양호하였던 청색광 하의 B구에서의 shoot의 분화나 bulb의 형성율이 가장 저조하게 나타났고, C구에서 shoot의 발생이 1.75개로 가장 양호하

게 나타났다. 또한 D구에서의 결과 역시 sucrose 3%배지에서와는 다르게 나타나 가장 저조하였던 적색광 하에서의 D구에서 shoot의 발생 1.5 및 bulb의 형성 0.85로 매우 양호한 결과를 보이고 있다.

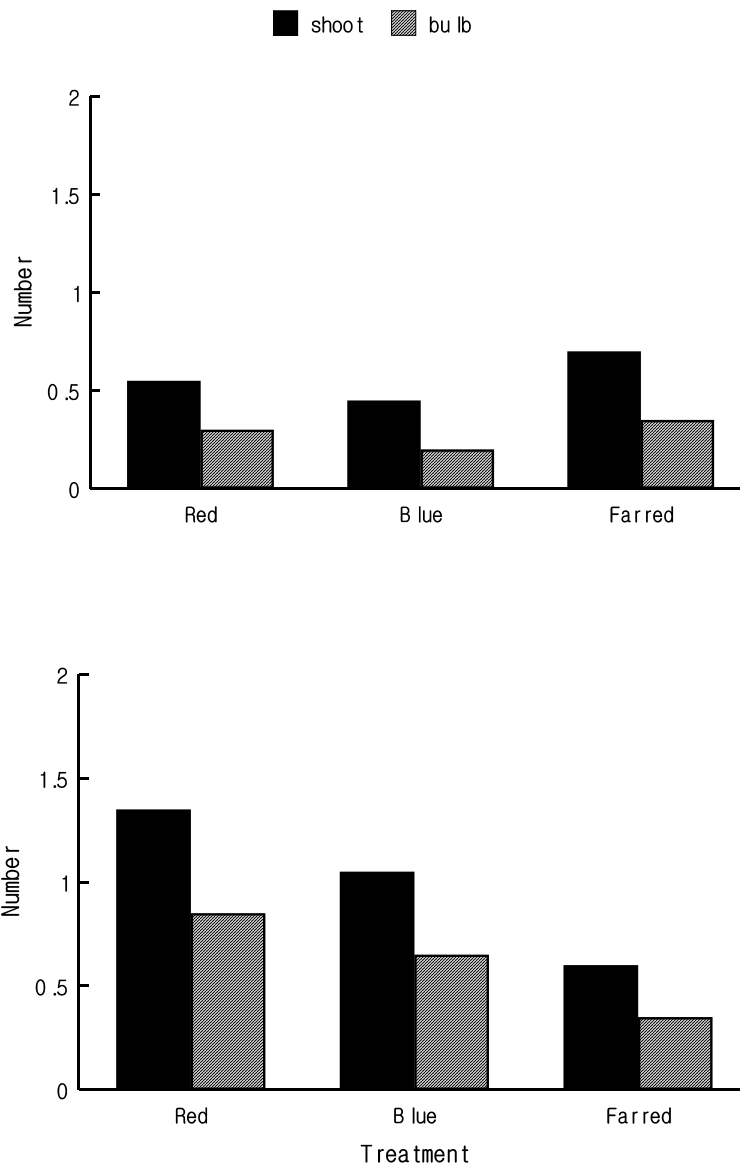


Fig. 15. 마늘의 생장점배양에서 광질에 따른 shoot의 발생 및 bulb의 형성
상; 3% sucrose, 하; 8% sucrose

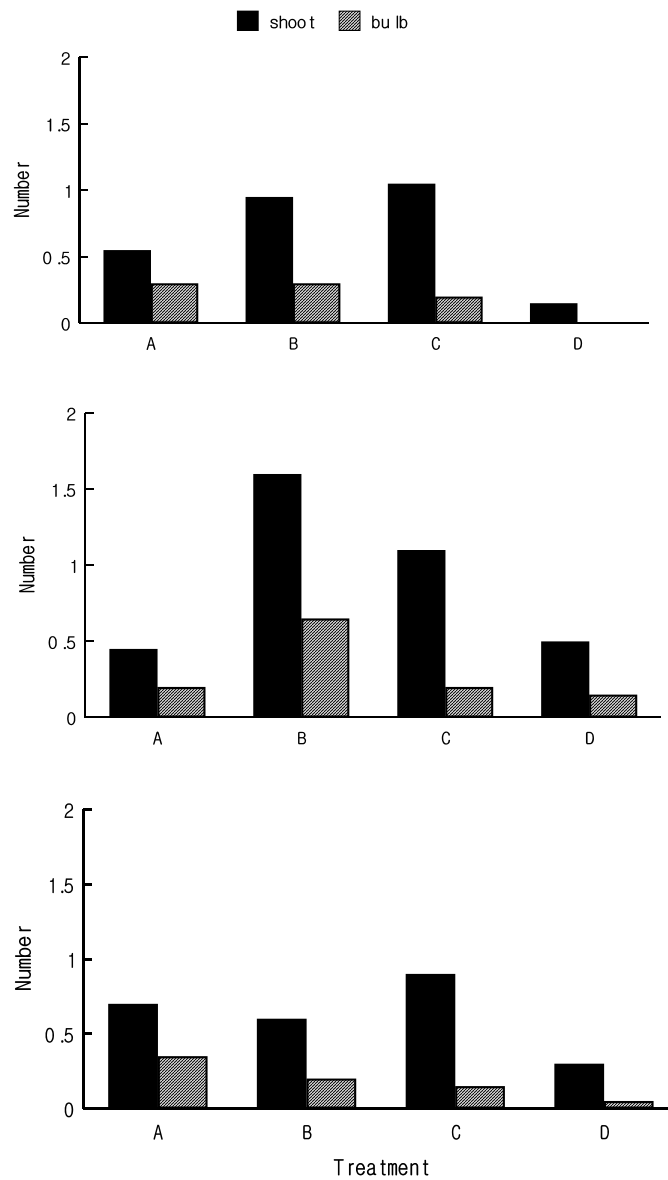


Fig. 16. Sucrose 3%가 첨가된 MS배지에서 마늘의 shoot 분화 및 bulb형성에 미치는 광질(상, 적색광; 중, 청색광; 하, 근적외선광) 및 성장조절물질의 영향. A, Control; B, BA 0.2+NAA 0.02mg · L⁻¹; C, BA 1+NAA 0.1mg · L⁻¹; D, Kinetin 2+NAA 0.2mg · L⁻¹.

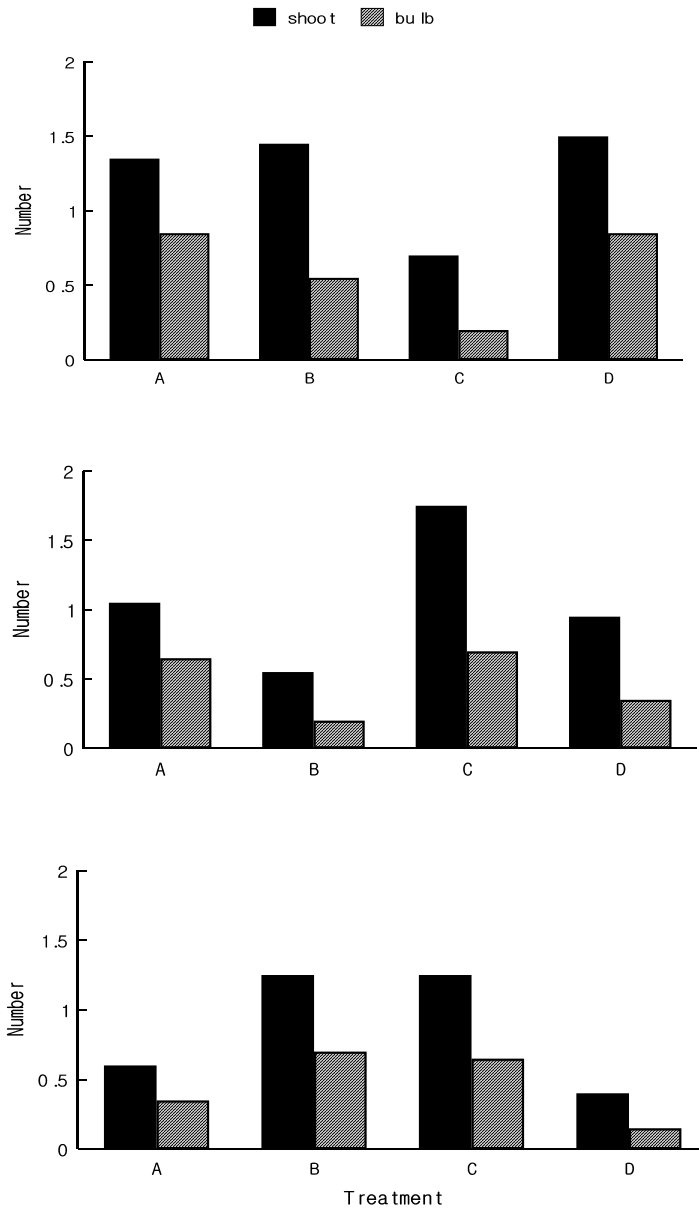


Fig. 17. Sucrose 8%가 첨가된 MS배지에서 마늘의 shoot 분화 및 bulb형성에 미치는 광질(상, 적색광; 중, 청색광; 하, 근적외선광) 및 성장조절물질의 영향.
 A, Control; B, BA 0.2+NAA 0.02mg · L⁻¹; C, BA 1+NAA 0.1mg · L⁻¹;
 D, Kinetin 2 +NAA 0.2mg · L⁻¹

10) 생장조절물질이 첨가된 배지에서의 multiple-shoot 유도

전단계의 실험에서 sucrose 3%, 생장조절물질 BA 2 + NAA 0.02mg · L⁻¹ 첨가된 배지에서 shoot의 형성이 1.45개로 양호하였음을 토대로 MS배지에 첨가하는 cytokinin인 BA를 kinetin으로 교체하여 각각 1, 2, 4mg · L⁻¹의 농도로 처리하고 auxin으로는 IAA와 NAA를 각각 0.2mg · L⁻¹의 농도로 처리하였다.

배양 후 30일 경과한 시점에서의 shoot와 bulb 형성 정도를 비교한 결과 Fig. 18 및 Fig. 19에서와 같이 kinetin 4 + IAA 0.2mg · L⁻¹ 첨가된 배지에서 가장 양호하였다. 이 처리구에서의 shoot의 발생이 2.2개, bulb 형성이 1.5개로 나타났으며 이 결과는 BA 또는 NAA 첨가 배지보다 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

Sucrose 3%가 첨가된 기본 MS배지에 각각 다른 cytokinin류의 생장조절물질 BA와 kinetin, auxin류의 IAA와 NAA의 첨가는 shoot 발생과 bulb형성에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

Kinetin과 IAA첨가로 1개의 경정배양으로부터 유도된 multiple-shoot에서 Fig. 20과 같이 양질의 다수 기내구로 발달시킬 수 있으며, 현재까지의 연구과정에서 더 많은 양의 multiple-shoot를 발생시킬 수 있는 가능성을 열어 주었다.

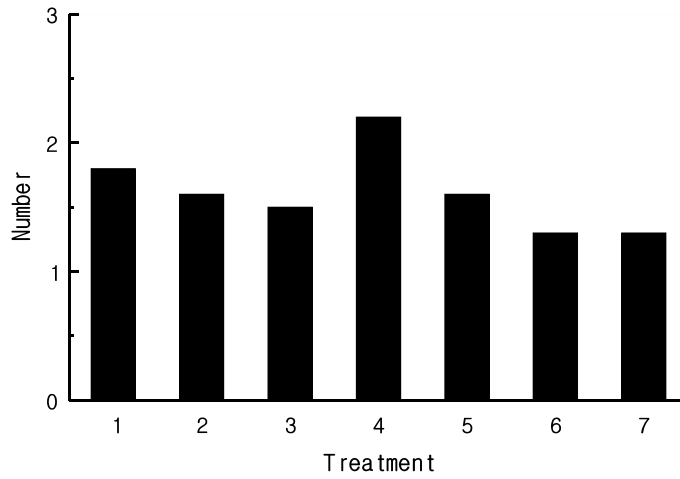


Fig. 18. Kinetin과 IAA 첨가 배지에서 shoot의 발생정도

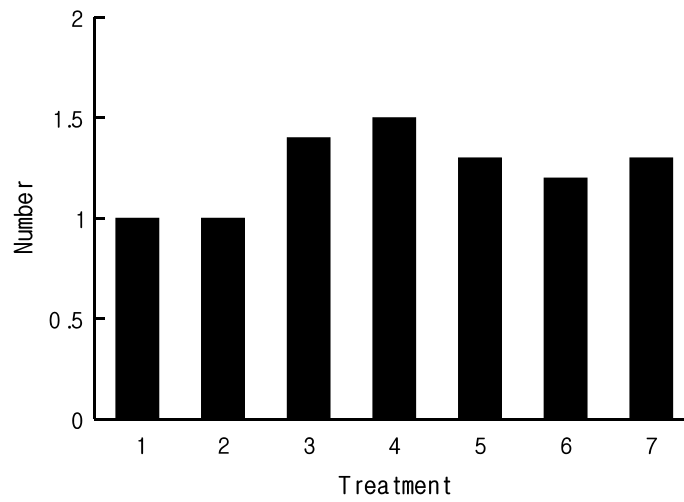


Fig. 19. Kinetin과 IAA 첨가된 배지에서 bulb의 발생정도



Fig. 20. 분화된 multiple-shoot로부터 분화, 유도된 bulblet.

A, 1개의 구; B, 2개의 구; C, 3개의 구; D, 4개의 구가 형성되었다.

11) 2iP 와 kinetin 및 IAA 조합처리에 따른 생장 비교(2006년)

multiple-shoot를 유도하기 위하여 전 실험에서 처리한 kinetin을 2iP로 교체처리 하였다. 기본 MS고체배지에 sucrose 3%를 첨가하고 2.0, 4.0mg · L⁻¹의 2iP와 0.2mg · L⁻¹의 IAA를 복합처리한 후 생장점을 치상하여 2 개월 동안 25℃, 16시간 일장으로 배양한 후 유도된 shoot분화와 bulb의 형성을 조사하였다.

Fig. 21과 같이 shoot의 분화를 조사한 결과, 2.0mg · L⁻¹의 2iP와 0.2mg · L⁻¹의 IAA처리구에서 1개의 생장점으로부터 분화된 shoot의 수는 2.2개로 가장 양호하였으며, 대조구인 무처리구와 4.0mg · L⁻¹ 2iP구와 0.2mg · L⁻¹ IAA처리구에서는 큰 차이가 없었다. Bulb의 형성에 있어서는 모든 처리구간의 큰 차이가 없었다. 따라서 multiple-shoot를 유도하기 위하여 처리한 2iP의 농도는 2.0mg · L⁻¹이 효과적이었다.

그러나 전년도 실험에서 multiple-shoot를 유도하기 위한 조건으로 양호하였던 kinetin과 비교하기 위하여 실험한 결과는 Fig. 22. 에서와 같이 shoot의 분화에 있어서 4.0mg · L⁻¹ kinetin + 0.2mg · L⁻¹ IAA처리구와 2.0mg · L⁻¹ 2iP + 0.2mg · L⁻¹ IAA처리구간의 큰 차이는 나지 않았으나 대조구인 무처리구에 비해 양호하였다. Bulb의 형성에 있어서는 모든 처리구간의 차이를 볼 수 없었다. 따라서 경제적인 면을 고려해 볼 때 4.0mg · L⁻¹의 kinetin을 처리하는 것보다 2.0mg · L⁻¹의 2iP를 처리하는 것이 더 효과적인 것으로 판단된다.

12) 총포배양에 의한 multiple-shoot 유도

마늘의 생장점을 이용한 배양에서의 multiple-shoot의 유도조건이 마늘의 총포미숙화기를 이용한 배양에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전년도 충남농업기술원에서 실험결과에서 양호하였던 1.0mg · L⁻¹ BA와 0.1mg · L⁻¹ NAA의 복합처리구와 비교해 보기 위하여 실험하였다. 기본 MS고체배지에 sucrose 3%를 첨가하고 1.0mg · L⁻¹ BA와 0.1mg · L⁻¹ NAA를 복합처리와 2.0, 4.0mg · L⁻¹의 2iP와 0.2mg · L⁻¹의 IAA를 각각 복합처리한 배지에 미숙 총포의 생장점 부위를 치상하여 25℃, 16시간 일장으로 배양하여 shoot의 분화와 bulb의 형성을 조사하였다.

Fig. 23과 같이 shoot의 분화를 조사한 결과는 대조구인 무처리구에 비해서 모든 처리구에서 양호하였고 특히, 2.0mg · L⁻¹ 2iP + 0.2mg · L⁻¹ IAA의 복합처리구에서 가장 양호하였다. Bulb의 형성에 있어서는 모든 처리간에 큰 차이가 없었다. 각 처리구에서 1개월 동안 배양한 후 bioreactor로 옮겨 2개월 동안 배양하여 생산된 bulb의

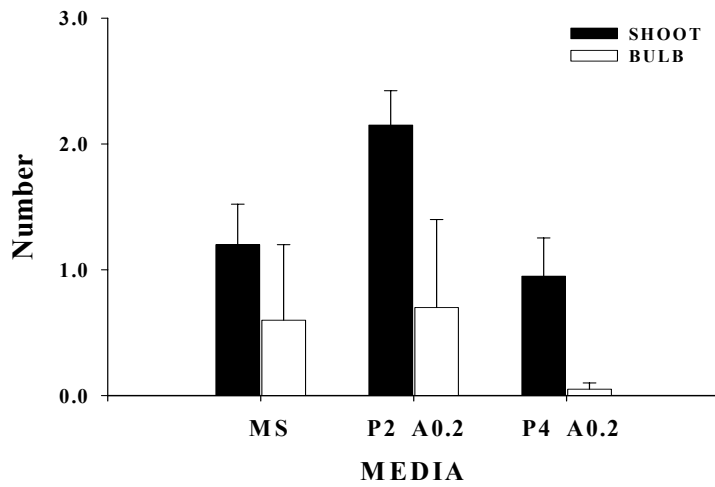


Fig. 21. 마늘의 성장점을 2iP 처리농도에 따른 고체배지에서 2개월 배양 후 유도된 shoot와 bulb의 형성수 A : MS, B : 2iP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C : MS + 2iP $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

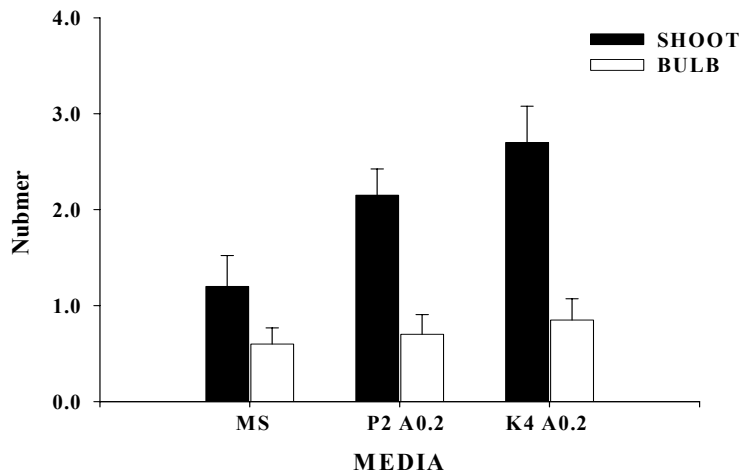


Fig. 22. 마늘의 성장점을 2iP와 kinetone 처리에 따른 고체배지에서 2개월 배양 후 유도된 shoot와 bulb의 형성수 A : MS, B : 2iP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C : MS + kinetone $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

직경에 있어서는 Fig. 24에서와 같이 모든 처리구에서 큰 차이는 없었으나 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA처리구에서는 저조한 양상을 보였다. Fig. 25와 같이 bulb의 무게에 있어서는 직경과 비슷한 결과를 보였다.

그러나 최종적으로 생산된 bulb의 수량에 있어서는 Fig. 26과 같이 대조구와 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 처리구간의 큰 차이는 없었고, $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2iP + $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA처리구에서 1.9개로 가장 양호하였다. 각 처리 배지에서 6개월간 장기배양한 후 마늘의 생육을 관찰한 결과, 무처리구(A)에서는 평균 1개의 단구가 형성되었고, BA와 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 처리구(B)에서는 2~3개의 bulb가 형성되었으며, $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA처리구(C)에서는 multiple-shoot와 크기가 작은 3~5개의 bulb가 생산되는 것을 보여 주었다(Fig. 27). 따라서 성장점 배양에서 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2iP + $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA처리구에서 양호하였던 결과와 BA와 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA의 첨가시 callus 형성과 유식물체에 나타나는 유리화 현상이 잦은 점을 고려해볼 때, $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2iP + $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA처리에서 가장 양호한 효과를 볼 수 있음을 확인하였다. 또한 고체배지에서의 장기배양에서 multiple-bulb를 생산하는 방법은 경제적이거나 시간적으로 효율적이지 못하므로 multiple-shoot 유도단계와 multiple-bulb 비대유도의 **2단계 배양법**으로 나누어 우량종구를 생산하는 방법이 필요할 것으로 생각된다.

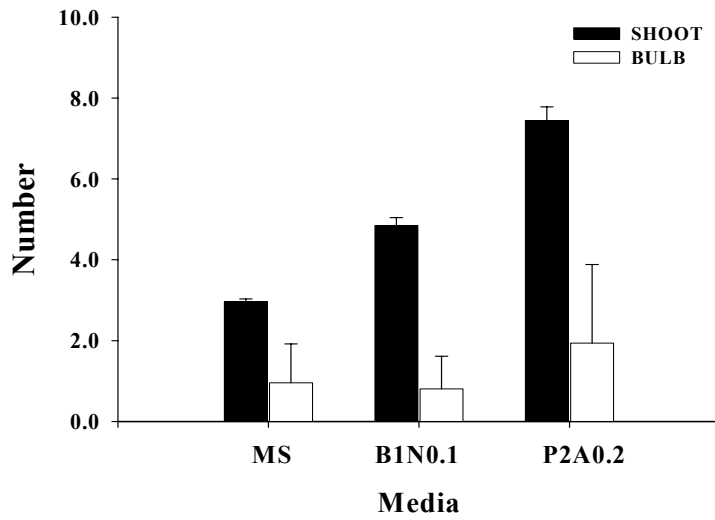


Fig. 23 . 마늘의 총포를 성장조절물질 처리된 고체배지에서 1개월 배양 후 유도된 shoot와 bulb의 분화수 A : MS, B : MS + BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C : MS + 2iP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

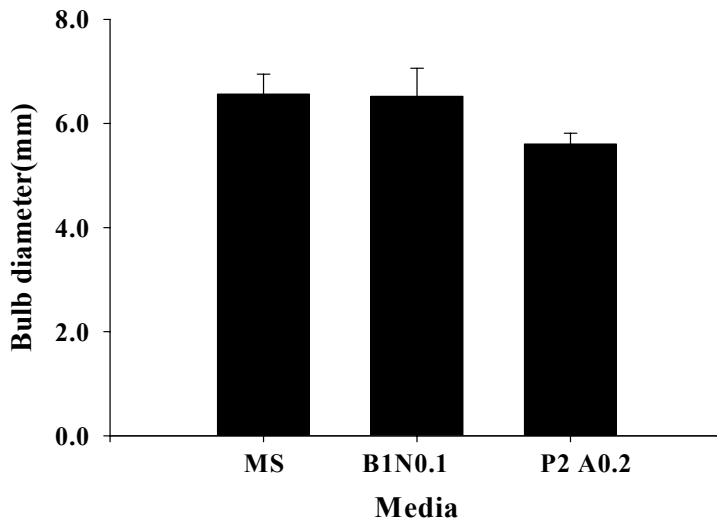


Fig. 24. 마늘의 총포를 성장조절물질 처리된 고체배지에서 2개월 배양 후 MS액체배지로 옮겨 1개월 배양하여 생산된 bulb의 직경 A : MS, B : MS + BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C : MS + 2iP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

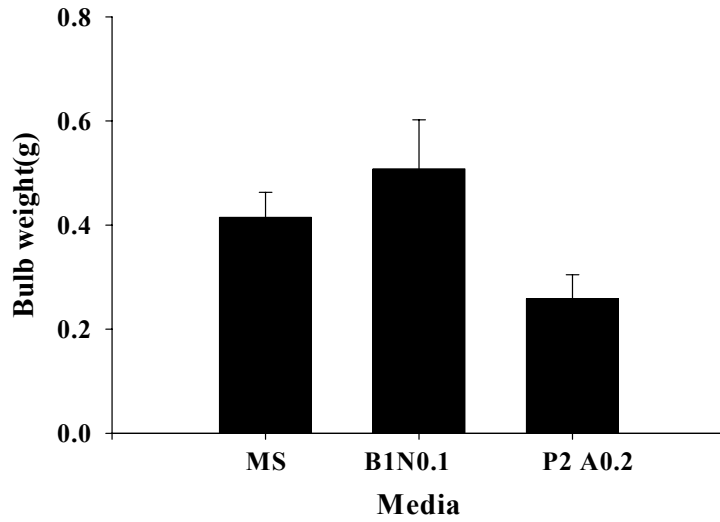


Fig. 25. 마늘의 총포를 생장조절물질 처리된 고체배지에서 2개월 배양 후 MS액체배지로 옮겨 1개월 배양하여 생산된 bulb의 무게 A : MS, B : MS + BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C : MS + 2iP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

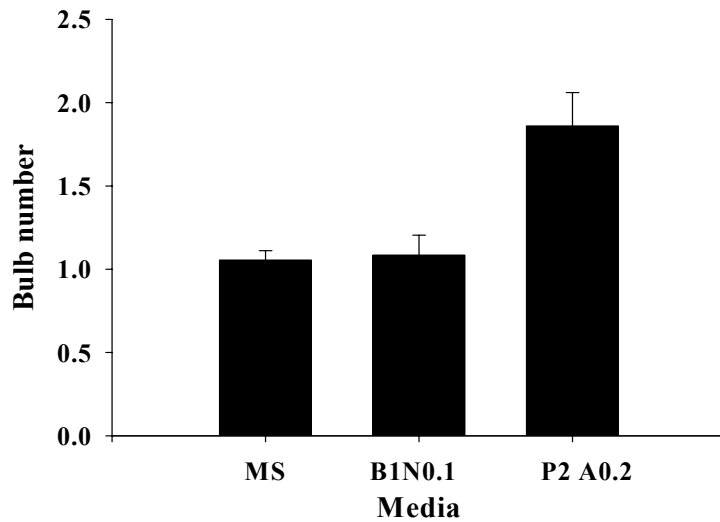


Fig. 26. 마늘의 총포를 생장조절물질 처리에 따른 고체배지에서 2개월 배양 후 액체배지에서 1개월 배양후 생산된 bulb의 형성수 A : MS, B : MS + BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C : MS + 2iP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

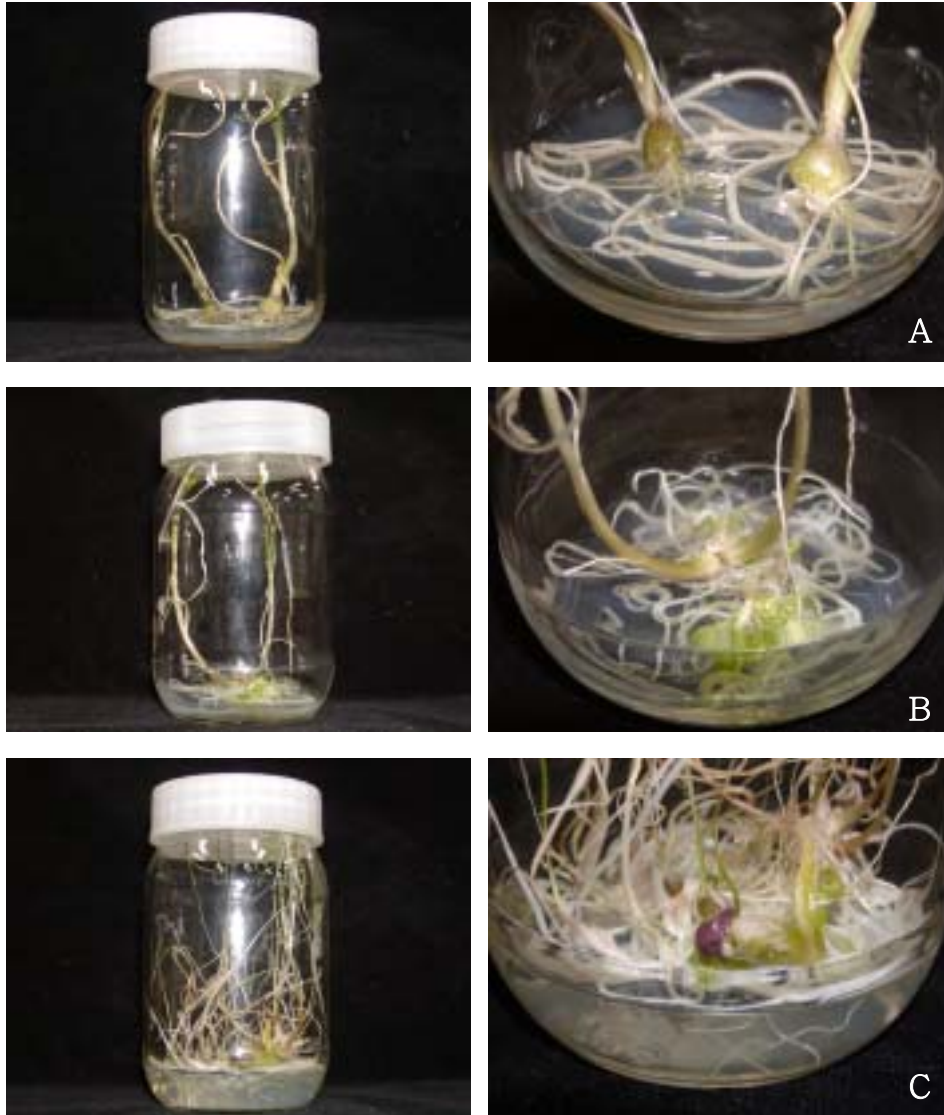


Fig. 27. 마늘의 총포배양시 성장조절물질 처리된 배지에서의 6개월 후의 생육상태
 A : MS, B : MS + BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C : MS + 2iP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

13) 광도에 따른 shoot의 분화와 bulbs형성의 비교

광의 세기가 마늘의 성장점 배양시 shoot의 발생 및 bulb의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 할로겐 램프와 3상에서 광을 조사해 줄 수 있는 growth chamber에서 25℃, 16시간 일장으로 배양하였다. 마늘의 성장점을 치상한 배양병을 놓은 위치별로 광도를 광도계로 측정된 결과 3상의 형광등과 할로겐 램프가 직접적으로 영향을 미치는 상위 부분은 250lm이었고 할로겐 램프에서 원거리에 있는, 3상의 형광등만이 영향을 미치는 하위 부분은 80lm이었다.

Shoot의 분화 및 bulb의 형성수를 조사한 결과, Fig. 28과 같이 두 처리구간에 큰 차이는 보이지 않았다. 그러나 Fig. 29에서와 같이 80lm의 광도가 약한 처리구에서는 shoot의 초장이 도장한 반면 250lm의 광도가 강한 처리구에서는 shoot의 초장이 짧게 생육된 것을 볼 수 있었다. 또한 성장점 배양 초기단계에서 80lm의 광도가 약한 처리구에서는 callus와 유리화 현상이 많이 나타남을 관찰할 수 있었으나 250lm의 광도가 강한 처리구에서는 선명하게 분화되는 shoot 및 bulb의 형성을 관찰할 수 있었다. Fig. 30에서는 전 실험에서 얻어진 결과에 따라 multiple-shoot를 유도하는 배지 조건인 2iP 2.0 + IAA 0.2mg · L⁻¹배지에서 성장점을 1개월 배양한 마늘(A), 성장점 배양 2개월 후 multiple-shoot로 분화된 마늘(B)을 기본 MS액체배지에 옮겨 1개월간 계대배양할 경우 multiple-bulb가 생산되는 것을 관찰 할 수 있었다.

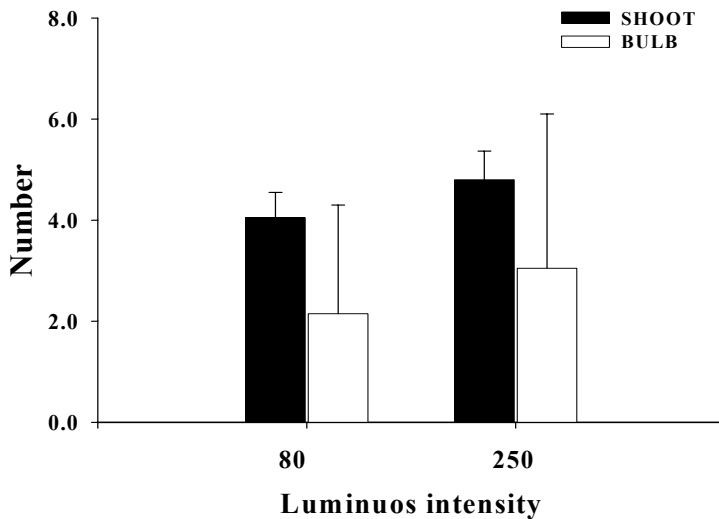


Fig. 28. 마늘의 성장점배양에서 광도에 따른 shoot의 분화 및 bulb의 형성수

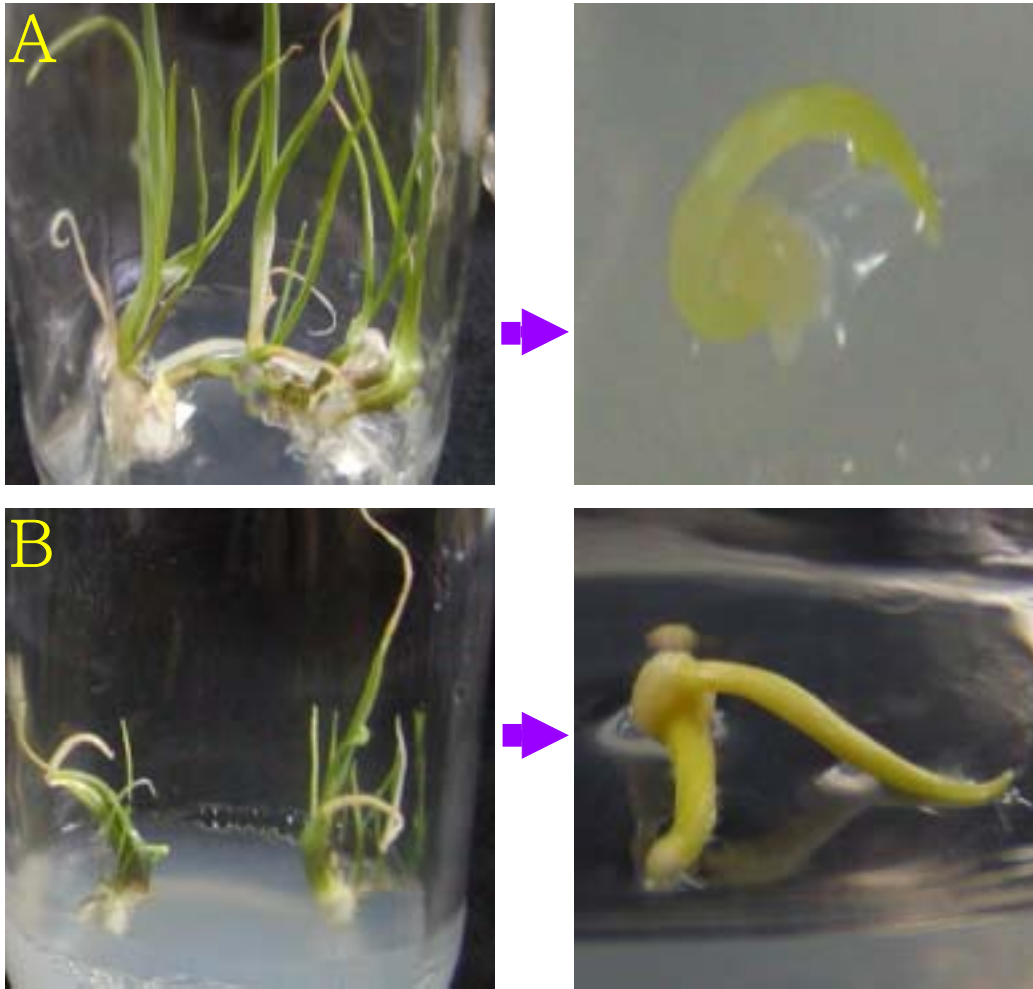


Fig. 29. 마늘의 생장점배양에서 광도에 따른 shoot의 발생 및 bulb의 분화양상
 A, 80lm 처리구; B, 250lm 처리구.

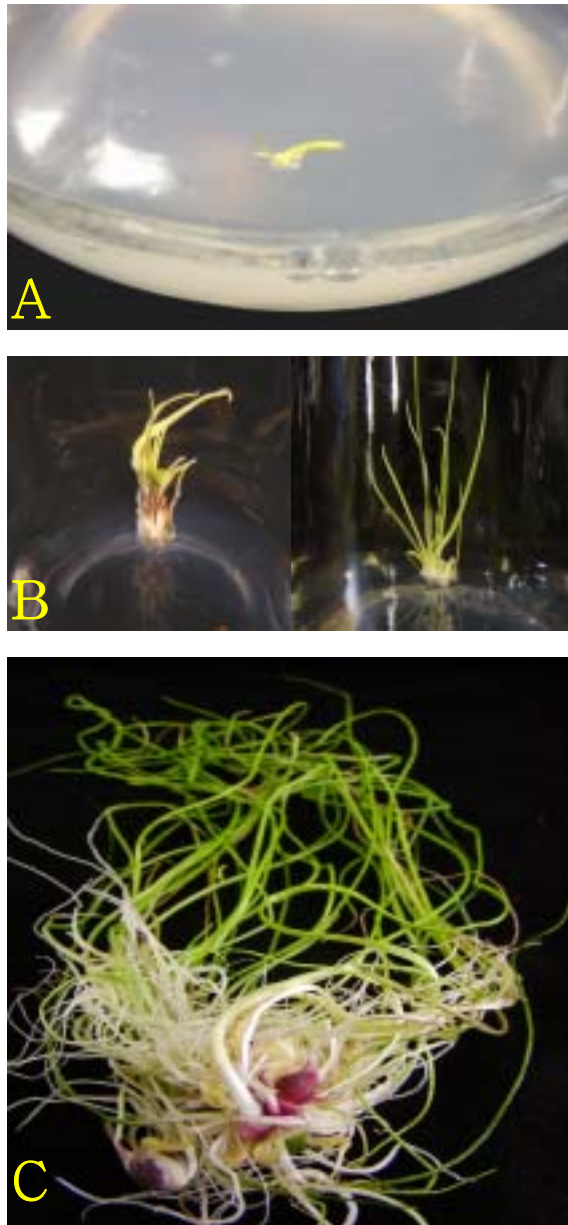


Fig. 30. 마늘의 성장점을 $2iP\ 2.0 + IAA\ 0.2mg \cdot L^{-1}$ 배지에서 1개월 배양하여 multiple-shoot를 유도시킨 후 bioreactor를 이용하여 기본 MS액체배지에서 생산된 multiple-bulb. A, 성장점 배양 1개월 후; B, 성장점 배양 2개월 후의 multiple-shoot; C, 성장점배양 2개월 후 MS배지에서 1개월 계대배양하여 생산된 multiple-bulb.

나. Shoot-bud 이용한 생물반응기배양 시스템 개발

1) 성장조절물질의 효과

고체배지배양 보다 대형화의 가능성이 있는 생물반응기배양 시스템을 개발하여 실용화하고자 하였다. 첫 단계로 5L 배양기에 1L의 액체 배지를 넣었다. 배양할 재료로는 생장점을 절취한 후 MS기본 고체배지에서 20일간 예비배양한 재료를 용기 1개당 20개씩 옮겨 배양을 시작하였다. 배지의 종류로는 기본배지의 종류를 MS배지와 LS(Linsmyer and Skoog, 1965) 배지의 두 종류로 하였다. 배지에 첨가한 성장조절물질의 조성으로, (A) MS, BA 0 + NAA $0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (0.8% agar 고체배지); (B), MS, BA 0.2 + NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; (C), MS, BA 0 + NAA $0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; (D), LS, BA 2 + NAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; (E), LS BA 0.2 + NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; (F), LS, BA 0 + NAA $0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 6 처리구를 설정하였고, 배양은 $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 에 16/8의 장일로 하였으며, 에어펌프를 이용한 하부공기주입방식을 채택하였다.

3월 18일부터 4월 26일까지 40일간 배양한 결과는 Fig. 31과 같다. 생물반응기에서 배양하였을 경우는 어느 처리구에서나 고체배지(A구)에서보다 생육이 비교되지 않을 정도로 왕성함을 알 수 있다. 다만 BA 2 + NAA 0.2의 비교적 성장조절물질의 농도가 높았던 LS배지의 경우에는 신초의 생육이 비정상적인 경우가 많이 발견되고 아울러 생육이 지속되지 못하고 50일간의 배양시간이 경과할 무렵 수침상으로 고사하는 경우가 많이 나타났다. BA 0.2 + NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 처리구에서는 MS배지(B구)나 LS배지(E구) 어느 경우에서나 생육이 양호하였지만 MS배지의 경우에는 발근 상태가 양호하였고, 인경구의 분화가 가시적으로 나타났다. LS배지의 경우에는 지상부의 발육은 보다 양호하였으나 발근이나 인경구의 분화는 MS배지에 비해 저조하였다.

성장조절물질을 첨가하지 않은 배지에서는 MS배지에서나 LS배지 어느 경우에서도 (B)구나 또는 (E)구에 비해 지상부의 충실도가 떨어졌지만 발근의 양태는 뚜렷하게 양호하였고, 인경구의 분화는 현저하였다. 특히 MS배지의 경우에는 거의 모든 이식체에서 직경 7 mm 이상의 비교적 대형의 인경구가 분화되어 토양이식에 충분할 정도의 소인경구를 단기간에 획득할 수가 있었다.

따라서 생물반응기의 이용은 단기간에 우량한 소인경구의 획득의 가능성을 시사하였을 뿐 아니라, 배양액의 교체가 용이하기 때문에 초기에는 BA 0.2 + NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 LS배지에서 배양을 한 후 중반 이후에 성장조절물질이 포함되지 않은 MS배지로 대체 계대배양을 할 경우 보다 대형의 소인경구를 생산할 수 있다는 가정도 정립할 수 있다.



Fig. 31. 생물반응기(Bioreactor)에서의 40일간 배양(3/18 - 4/26)

A) MS, B0N0,

D) LS, B2N0.2;

B) MS, B0.2N0.02;

E) LS B0.2N0.02 (3/18-4/27)

C) MS, B0N0;

F) LS, B0N0;

2) Bioreactor를 이용한 마늘 기내구 비대 및 성장 비교

생장점 배양을 통해 유도된 단일 shoot 또는 multiple-shoot와 bulb의 비대와 성장정도를 구명하기 위해 먼저 bioreactor에 옮겨 25℃ 및 16시간의 일장으로 90일 동안 계대배양 실험을 진행하였다.

생장점을 고체 배지에 초기 배양하였을 경우 30일이나 60일이 경과한 후에도 발근이 거의 되지 않았다. 그러나 액체배양으로 계대배양을 한 후에는 60%에서 95%까지 발근이 되었다. 성장조절물질이 첨가되지 않은 같은 조건에서 고체배지 60일과 액체배지 60일에서의 발근률은 명확한 차이는 나타나었으며, 액체로의 계대배양이 발근에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다. 또한 용적이 큰 bioreactor 가 용적이 작은 배양병보다 발근정도가 양호하였다.

마늘 구비대에 있어서 발근정도는 큰 영향을 미칠 것이라 생각된다. 실제로 액체배양에서 발근이 잘 된 것일수록 구의 비대정도가 양호하였다. 뿌리로부터 액체배지의 당과 양분의 흡수를 많아져 구비대를 증진시키는 것으로 생각된다.

생장점을 성장조절물질이 첨가되지 않은 sucrose 3% MS배지에 치상하여 30일 동안 배양한 후 3L bioreactor에 각각 sucrose가 3, 8, 11% 첨가된 액체배지를 1.5L 분주한 다음 생장점을 배양하였다. 90일 경과 후 성장정도와 구비대를 관찰하였다.

Fig. 32의 A, C, E는 bioreactor에서 배양과정 중인 상태를 보여준 것이며, B, D, F는 동일한 bioreactor에서 배양한 후 수확한 마늘 식물체의 생육정도를 보여준 것이다. 본 Fig. 13에서 A는 sucrose 3%, C는 8%, E는 11%를 나타낸 것으로 전체적으로 생육이 비교적 양호하였으나, 그 중에서도 sucrose의 농도가 3%인 B에서 근부의 발달이 가장 왕성하였다. 따라서 지상부의 생육정도 또한 양호하였다. 그러나 sucrose의 농도가 11%인 F구의 경우 지하부의 발생이 매우 미약하였으며 이로 인해 지상부의 생육 또한 양호하지 못함을 알 수 있다. Table 1은 수확한 마늘의 근중과 구를 포함한 지상부의 무게, 구경, 구중을 조사한 것으로, sucrose 3%에서 근중은 1.16g, 줄기와 구의 무게는 1.22g, 기내 인경구의 직경은 약 8.5mm로 sucrose 8%구나 11%구보다 양호하게 나타났다. 그러나 90일 경과한 후의 기내구의 구중은 sucrose의 농도가 증가함에 따라 양호해지는 경향을 보였다.

전단계 실험의 경우에서도 초기 생장점배양시 sucrose의 농도가 3%일 때 shoot의 발생이 양호했는데, bioreactor에서도 sucrose 3%가 양호했다는 것으로 보아 생장점을 초기에는 고체배지에서 배양한 후 bioreactor에 옮겨 계대배양할 경우에도 저농

도의 당으로 배양하는 것이 유리할 것으로 판단된다. 이는 대량 생산을 위한 경제적인 면에서도 매우 좋은 결과라 여겨지며 용적이 큰 액체 tank 배양에서도 적은 양의 당을 사용해서 성장점으로부터 유도된 multiple-shoot와 bulb의 비대를 증진시킬 수 있는 가능성이 충분히 있다고 판단되었다.

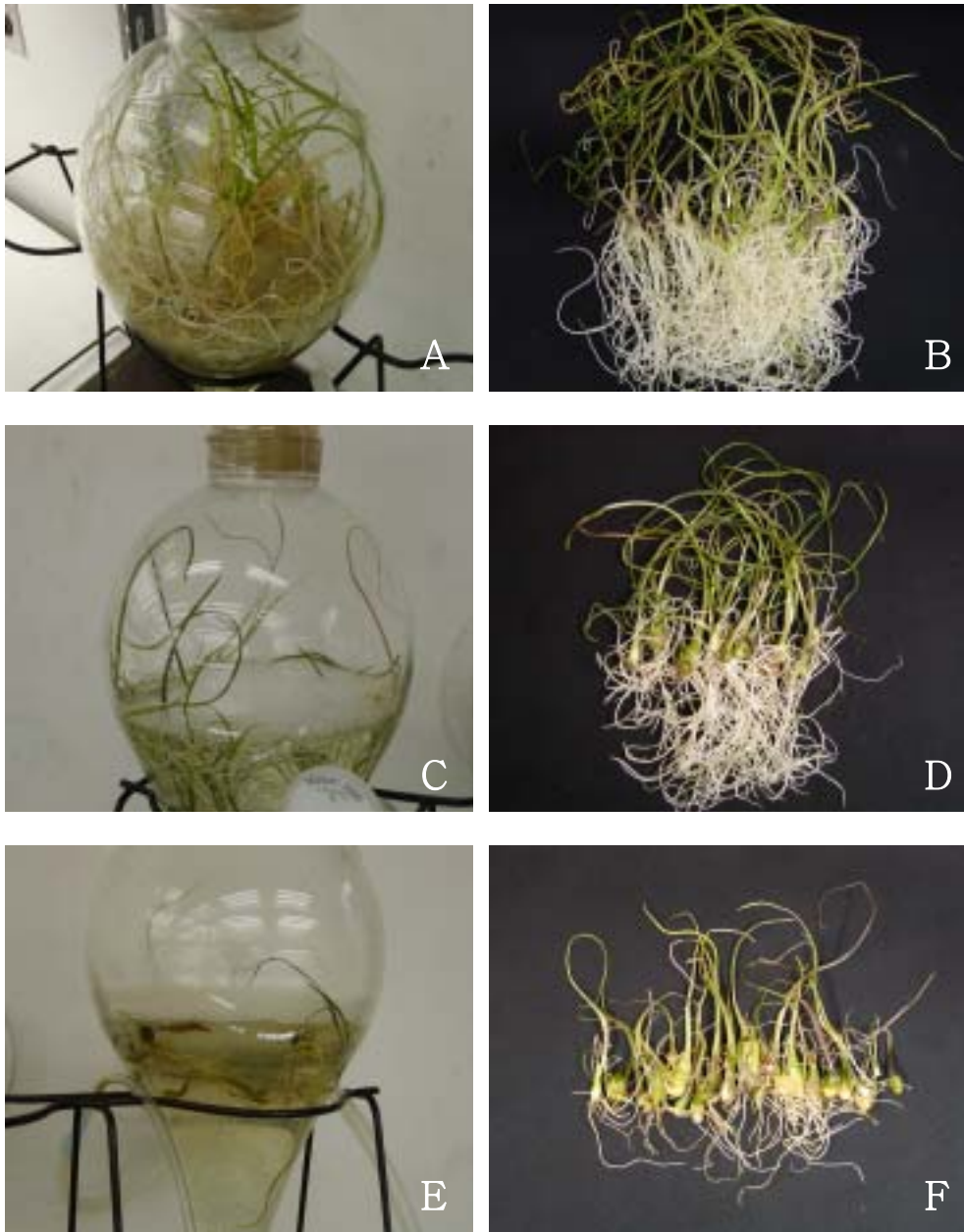


Fig. 32. Bioreactor 내에서 계대배양 중인 마늘의 상태. A, sucrose 3%구; B, A에서 수확한 마늘의 식물체; C, sucrose 8%구; D, C에서 수확한 마늘; E, sucrose 11%; F: E에서 수확한 마늘. 지하부의 발달이 sucrose 3%, 8%, 11%의 순으로 되어 있으

나 기내구의 발달은 역순으로 양호함을 보이고 있다..

Table 1. Bioreactor에서 90일간 계대배양한 후 수확한 마늘의 생육 조사

sucrose (%)	shoot wt (g)	root wt (g)	bulb diameter(mm)	bulb wt (mg)
3	1.220a	1.160a	8.453a	683c
8	1.081b	0.275b	7.350b	730b
11	0.929c	0.035c	6.971c	801a

3) Tank배양을 이용한 기내구 형성 및 비대유도

생장점으로부터 분화된 multiple-shoot와 bulb를 tank배양으로 대량생산하기 위한 활용방안으로 15L 시판용 생수통을 이용하여 배양을 하였다.

생장점을 sucrose 3%의 MS고체배지에 치상한 후 25℃, 16시간의 일장으로 30일 동안 배양한 후, sucrose 8%가 첨가된 액체배지에 옮겨 tank 배양을 실시하였다. 구 비대를 위한 성장조절물질은 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹, BA 0.2 + NAA 0.2mg · L⁻¹, BA 0.2 + NAA 2mg · L⁻¹을 첨가하였으며, 성장조절물질이 첨가되지 않는 기본 MS 액체배지를 대조구로 하였다. Tank에서 60일간 배양한 후 생육을 조사하였다.

Fig. 33의 A는 대조구, B는 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹, C는 BA 0.2 + NAA 0.2mg · L⁻¹, D는 BA 0.2 + NAA 2mg · L⁻¹를 각각 첨가한 것이다. 이 tank에서 60일 동안 배양된 후 수확한 마늘의 생육을 보면 Fig. 34와 같았다. 전체적인 생육은 대조구인 A구에서 양호한 것으로 보였으나 실제적으로 근중이나 줄기와 구의 무게에 있어서는 Table 2에서와 같이 성장조절물질이 첨가된 B처리구가 양호했다. Tank 내에서 shoot와 bulb의 구비대에 성장조절물질의 영향이 크게 미친다는 것을 알 수 있었다.

본 실험에서는 BA를 고정시키고 NAA의 농도를 다르게 하여 배양한 결과 NAA 농도가 높을 수록 생육이 현저하게 저하됨을 볼 수 있었다(Fig. 35). 수확 후에도 NAA농도가 높을 수록 구의 비대가 이루어지지 않았다.

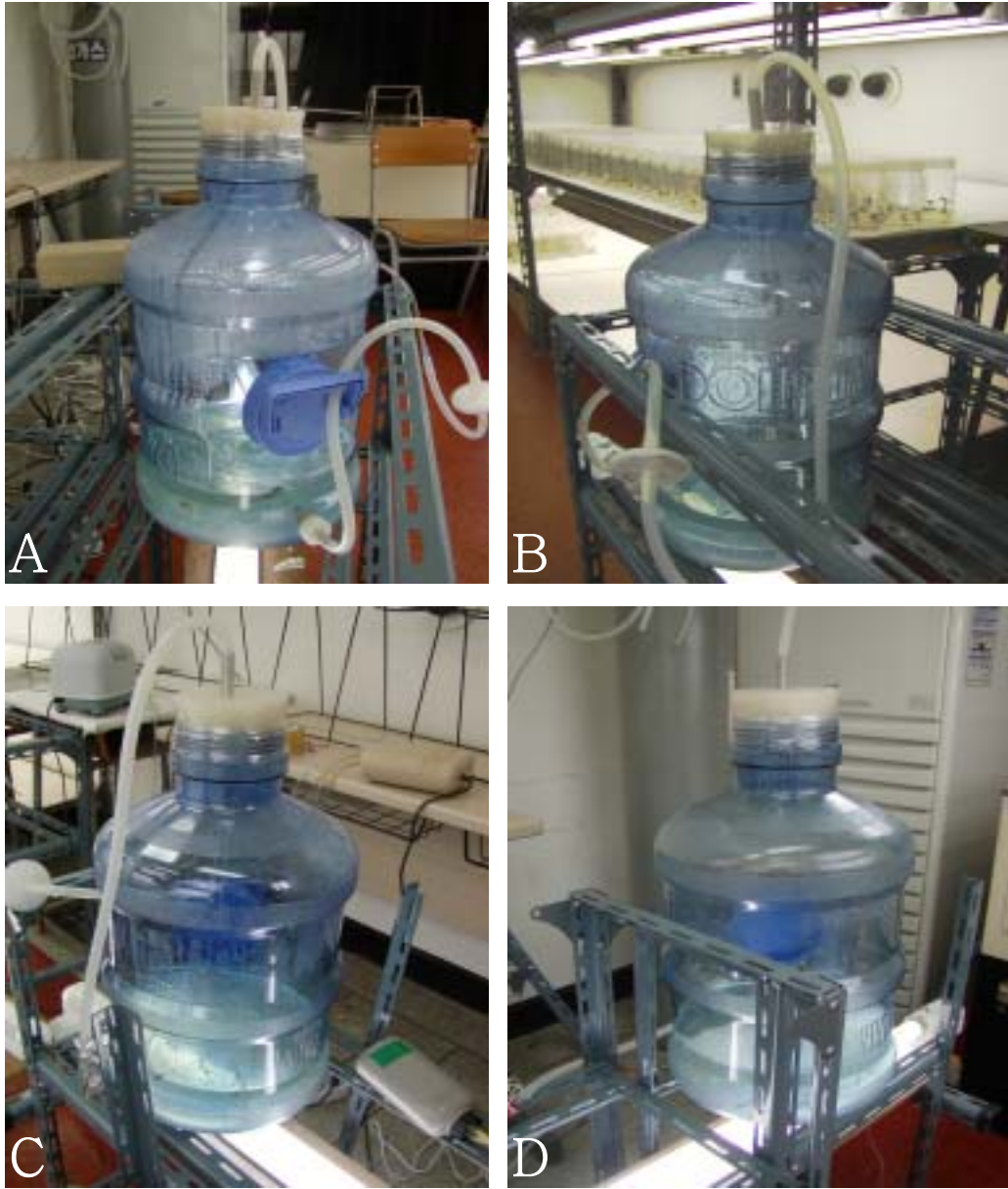


Fig. 33. 생장점으로부터 분화된 shoot의 tank 배양. A, Control; B, BA 0.2 + NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C, BA 0.2 + NAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; D, BA 0.2 + NAA $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.



Fig. 34. Tank배양에서 수확한 마늘의 구비대와 생육정도의 비교. A, Control; B, BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹; C, BA 0.2 + NAA 0.2mg · L⁻¹; D, BA 0.2 + NAA 2mg · L⁻¹.



Fig. 35. Tank에서 수확한 마늘의 풍건 후의 비대 정도 비교. A, Control; B, BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹; C, BA 0.2 + NAA 0.2mg · L⁻¹; D, BA 0.2 + NAA 2mg · L⁻¹.

Table 2. 고체배지에서 1차배양 후 tank에서 계대배양한 기내마늘의 생육

Treatment		Shoot wt (mg)	Root wt (mg)	Bulb diameter(mm)	Bulb wt (mg)
BA	NAA				
0	0	674	66	7.723	489
0.2	0.02	962	95	6.548	546
0.2	0.2	401	23	4.954	256
0.2	2	380	-	3.308	216

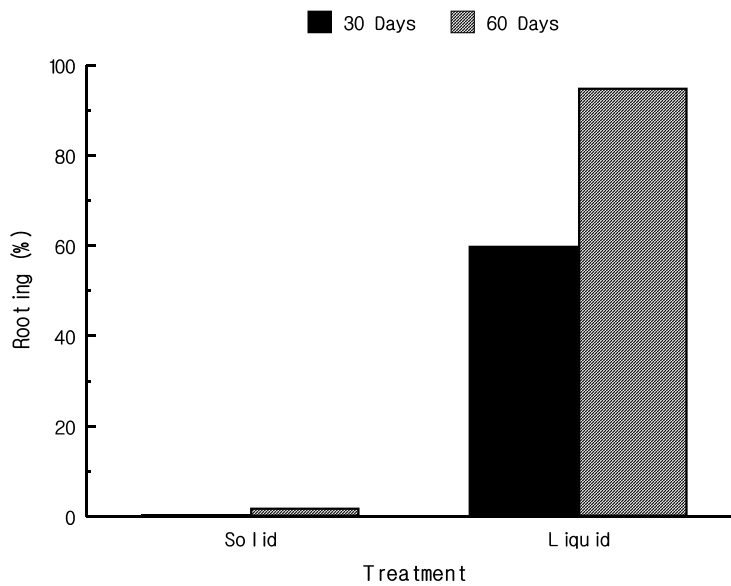


Fig. 36. 고체와 액체배지 상태에서의 마늘 생장점배양의 발근률



Fig. 37. Sucrose 3% 고체배지에 생장점 치상 후 60일 경과시의 생육상태



Fig. 38. 배양병(500mL)의 고체배지에서 배양된 마늘의 성장점배양 유래의 유식물체를 배양병(상) 및 bioreactor(하)의 액체배지로 계대배양한 후의 발근상태

4) multiple-shoot 유도배지에서의 multiple-bulb비대

마늘의 생장점을 기본 MS고체배지에서 1달 배양한 후 위 실험 결과에서 얻어진 multiple-shoot 유도조건에 옮겨 배양할 경우 multiple-bulb를 비대시킬 수 있는지 알아보기 위하여 multiple-shoot 유도조건인 고체배지에서 2개월 동안 유도된 shoot 및 bulb를 2차 보고서 실험에서 multiple-shoot 유도조건이었던 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS액체배지에 kinetin $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가하여 25°C , 16시간 일장으로 bioreactor 내에서 1달 동안 배양하였다.

Fig. 39.에서 볼 수 있듯이 대조구 무처리구에서는 고체배지에서 유도된 multiple-shoot가 multiple-bulb로 비대된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 multiple-shoot 유도조건이었던 kinetin $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 처리구에서는 bulb가 형성되는 기부부위가 심한 callus와 유리화 현상이 생기며 고체배지에서 유도된 multiple-shoot가 bulb로써 비대되지 않는 못하는 현상이 관찰되었다. 따라서 multiple-shoot 유도조건이었던 kinetin multiple-shoot $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 처리는 multiple-shoot 유도에서만 그 효과가 인정되고 구비대의 효과를 볼 수 없음을 확인하였다.



Fig. 39. multiple-shoot를 유도하는 조건의 kinetin $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 첨가한 기본 MS액체배지에서 생산된 multiple-bulb의 비대양상. A, MS기본배지; B, MS + kinetin 4.0 + IAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

5) Tank배양시 이식하는 shoot와 bulb의 수에 따른 구비대 효과

구비대 단계에서의 shoot 및 bulb의 개수가 bulb생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 multiple-shoot 유도조건배지에 성장점을 치상하고 2개월 동안 배양하여 multiple-shoot를 유도한 후 tank로 옮길 때에 shoot 및 bulb의 개수를 각각 1(A), 3(B), 5(C)개씩 한개체가 되도록 처리하여 30개체씩 기본 MS 액체배지에서 25℃, 16시간 일장으로 45일간 배양하여 bulb의 직경과 구중을 조사하였다.

Fig. 40에서 볼 수 있듯이 bulb의 직경에 있어서 모든 처리구간에 큰 차이를 보이지 않으나 B와 C의 처리구간에는 B처리구가 더 양호하였다. 그러나 Fig. 41에서 볼 수 있듯이 bulb의 구중에 있어서는 모든 처리구간의 큰 차이가 없었으며, 최종적으로 생산되는 bulb의 수량에 있어서는 오히려 A처리구가 가장 저조한데 반해 B, C의 처리구에서는 처리구간의 차이는 없었고 약 2배정도의 양호한 효과를 보였다 (Fig. 42, Fig. 43). 따라서, 1개의 개체에서 30개의 bulb를 생산해내는 것보다 3개씩 한개체로 30개를 처리하여 평균 2.5개를 처리할 경우 총 약 75개 정도의 bulb를 생산해낼 수 있을 것으로 보여 좀 더 효율적인 생산방법이라 할 수 있다고 사료된다. 그러나 생산되는 bulb의 총수량이 같도록 처리하였을 경우에도 동일한 결과를 보여 줄 것인가에 대해서는 좀 더 검토할 필요가 있다.

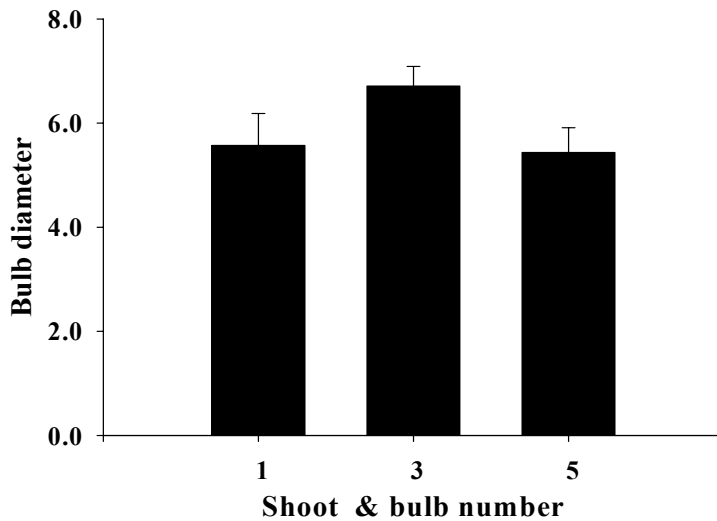


Fig. 40. Tank로 계대배양시 shoot 및 bulb의 개수가 구경에 미치는 영향

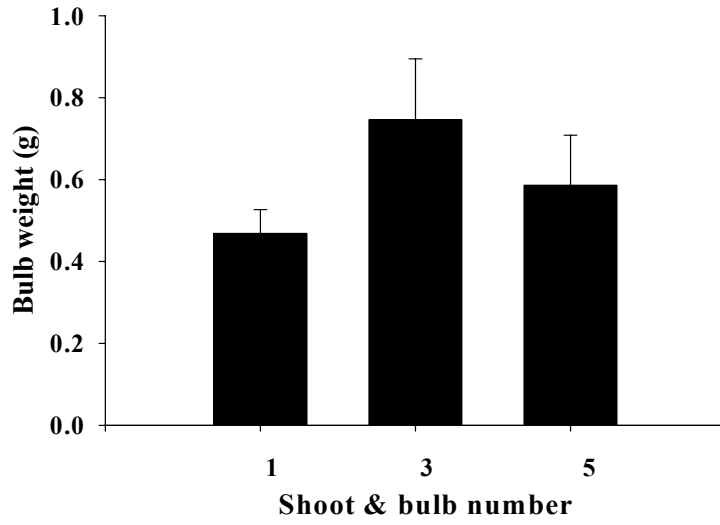


Fig. 41. Tank로 계대배양시 shoot 및 bulb의 개수가 구중에 미치는 영향

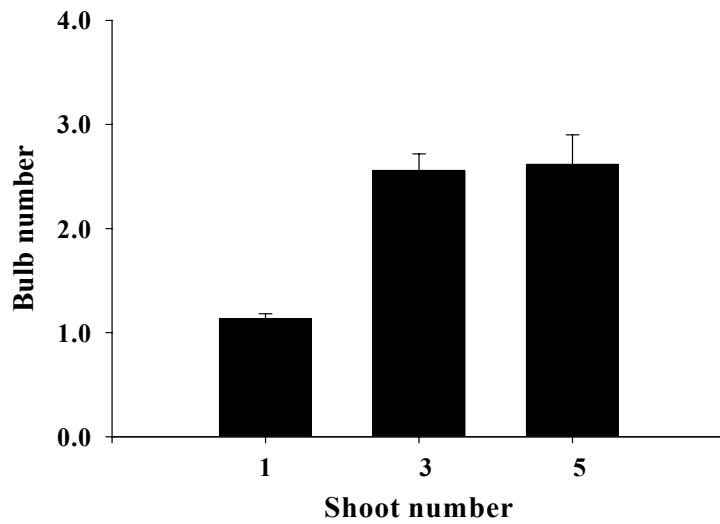


Fig. 42. Tank로 계대배양시 shoot 및 bulb의 형성에 미치는 영향



Fig. 43. Tank로 계대배양시 shoot 및 bulb의 개수에 따른 구비대
생장 비교. A : Shoot & bulb 1개, B : Shoot & bulb 3개, C :
Shoot & bulb 5개

6) multiple-shoot 유도배지와 CCC 첨가에서의 구비대

multiple-shoot의 분화유도에 있어서 양호하였던 $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kinetin + $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA의 복합처리가 전 단계 실험의 결과에 의하면 구비대 시키는 데는 효과가 크게 나타나지 않아 kinetin의 농도를 줄여 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 농도로 처리하고 IAA를 대신하여 구비대 촉진효과가 있는 CCC를 $700\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 처리하였다. 또한 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2iP + $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA의 복합처리와 CCC $700\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 단독처리가 생산된 multiple-bulb의 비대에 미치는 영향에 대해 서로 비교해서 검토해 보기 위한 실험을 수행하였다.

Fig. 44에서 볼 수 있듯이 대조구인 성장조절물질 무처리구(A)에 비해서 CCC $700\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 단독처리구(B)에서는 외피부위가 자색이나 황색으로 착색되면서 multiple-bulb로 비대되는 것을 뚜렷하게 볼 수 있었으나, multiple-bulb가 생산되는 반면 callus화 현상에 의한 bulb의 손실이 많았다. 그러나 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kinetin + $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA의 복합처리구(C)에서는 전 단계의 실험결과에서 볼 수 있었던 기부부위에서의 callus현상은 볼 수 없었으나 뚜렷한 bulb의 형태를 관찰할 수 없었다. 또한 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2iP + $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA의 복합처리구(D)에서는 multiple-bulb의 유도는 가능하나 bulb의 크기가 매우 작아 우량 종구로써의 효과를 인정하기 어려운 것들의 출현이 많았으며, 이러한 것들은 이용 불가로 판단되어 조사대상에서 제외하였다.

A처리구와 B처리구에서 최종적으로 생산된 bulb의 수량을 조사한 결과 Fig. 45에서와 같이 A처리구가 B처리구에 비해 약 2배정도로 양호하였다. 직경에 있어서도 A처리구가 B처리구에 비해 양호하였고, 무게에 있어서는 두 처리구 사이에 큰 차이를 볼 수 없었다(Fig. 46, Fig. 47).

따라서 multiple-shoot를 유도하는 조건으로 비대단계에서는 multiple-bulb를 비대 시키는 것에 큰 효과가 없는 것으로 판단되어 지며, 아울러 구비대를 촉진시킬 것으로 생각되어 첨가한 CCC의 효과도 볼 수 없었다. 그러나 CCC의 농도 및 배양과정에서의 효과적인 비대 시점을 찾아 좀 더 구체적으로 단계적인 배양방법을 통한 비대과정에서의 효과에도 동일한 결과를 보여 줄 것인가에 대해서는 좀 더 검토할 필요가 있고 이에 관한 실험은 계속 수행되고 있다.

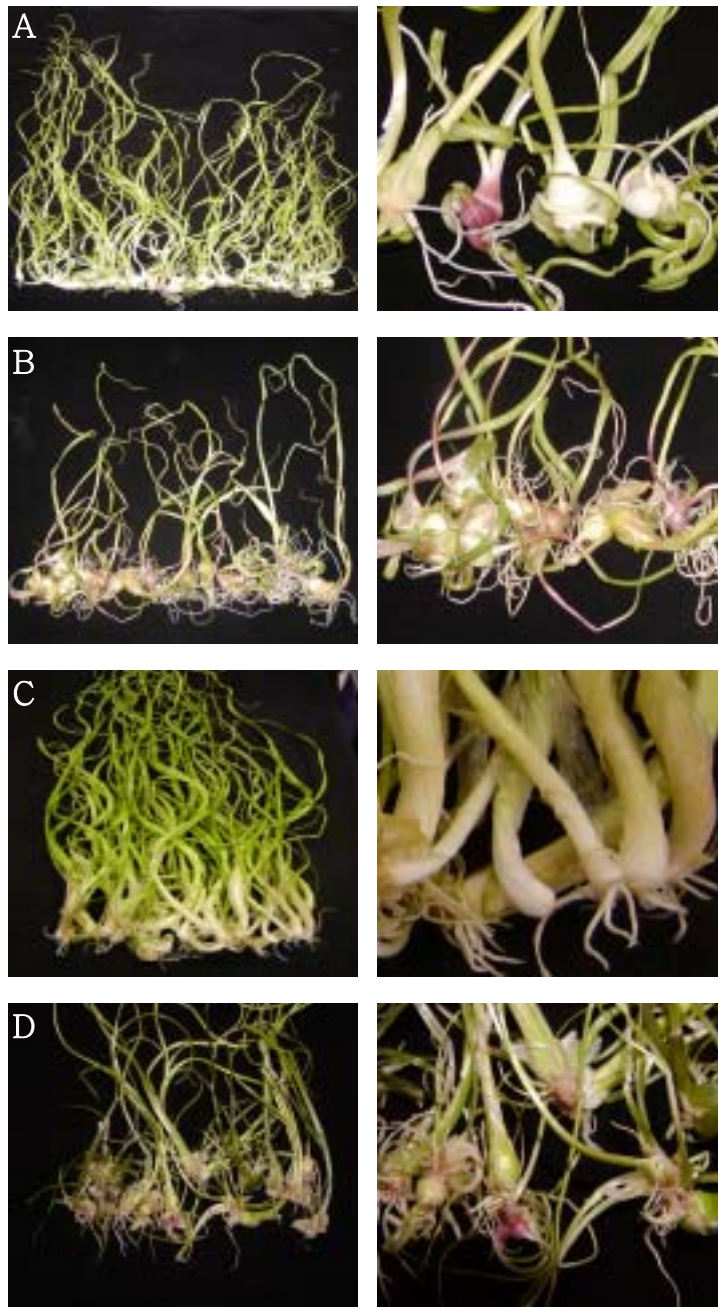


Fig. 44. 성장조절물질처리에 따른 액체배지에서의 shoot의 성장과 구의 비대형태.
 A, MS; B, MS + CCC700mg · L⁻¹; C, MS + kinetin 2.0 + CCC 700mg · L⁻¹; D,
 MS + 2iP + IAA 0.2mg · L⁻¹.

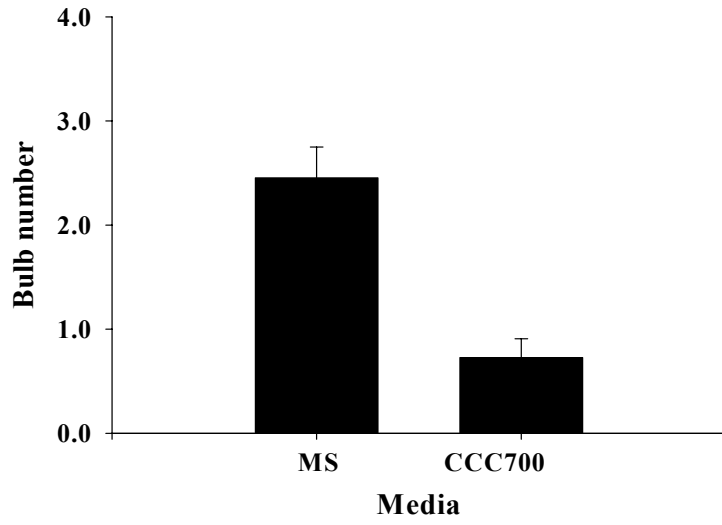


Fig. 45. CCC 700mg · L⁻¹의 첨가가 bulb의 형성에 미치는 영향

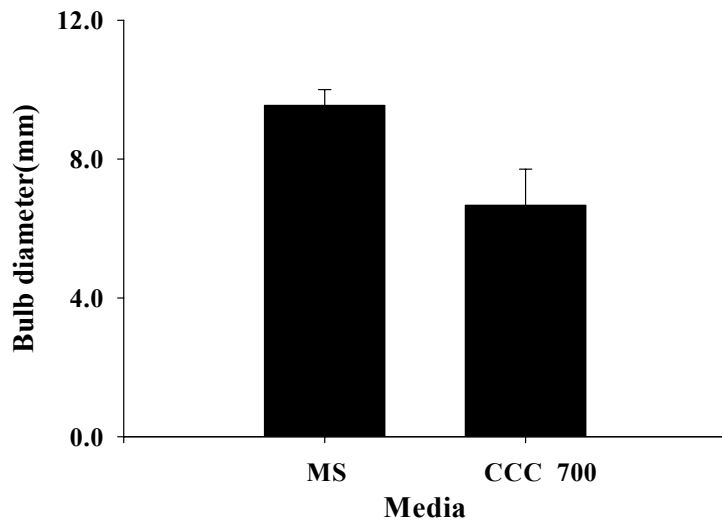


Fig. 46. CCC 700mg · L⁻¹의 첨가가 bulb의 직경에 미치는 영향

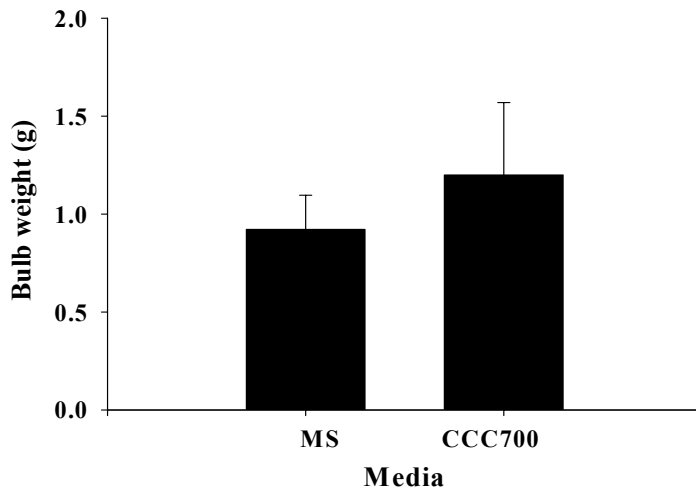


Fig. 47. CCC 700mg · L⁻¹의 첨가가 bulb의 무게에 미치는 영향

7) Sucrose 농도차에 따른 마늘 구비대 실험

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

multiple-shoot를 유도하는 조건의 배지에서 성장점을 2개월 동안 배양하여 multiple-shoot를 유도한 후, 3개씩 한 덩어리가 되도록 shoot를 처리하여 구비대시키기 위한 조건으로 시판용 10L tank를 이용하여 sucrose 농도를 3%와 8%로 설정한 기본 MS액체배지에 옮겨 25℃, 16시간 일장으로 45일간 배양한 후에 bulb형성을 조사하였다. Figure. 48에서와 같이 성장점배양에서의 유식물체의 생육에 있어서는 sucrose 3% 첨가조건에서 8% 첨가배지보다 양호하였다. 기내구 형성에 있어서는 bulb의 직경과 무게, 건조시킨 후의 직경과 무게를 조사한 결과에서는 8%의 sucrose 첨가한 조건에서 약간 양호하였다(Fig. 49, 50, 51, 52). 그러나 Fig. 53에서와 같이 최종적으로 생산된 bulb의 수량에 있어서는 sucrose 3% 첨가조건에서 양호한 효과를 보였다. 따라서 마늘의 bulb 비대과정에서 고농도의 sucrose농도가 bulb의 형성을 촉진시키지만 큰 차이를 보이지 않으며 최종적으로 생산되는 bulb의 수량에 있어서 우수한 효과가 인정되지 않아 비대과정에서도 sucrose를 3%로 처리하는 것이 경제

적이라 사료된다.

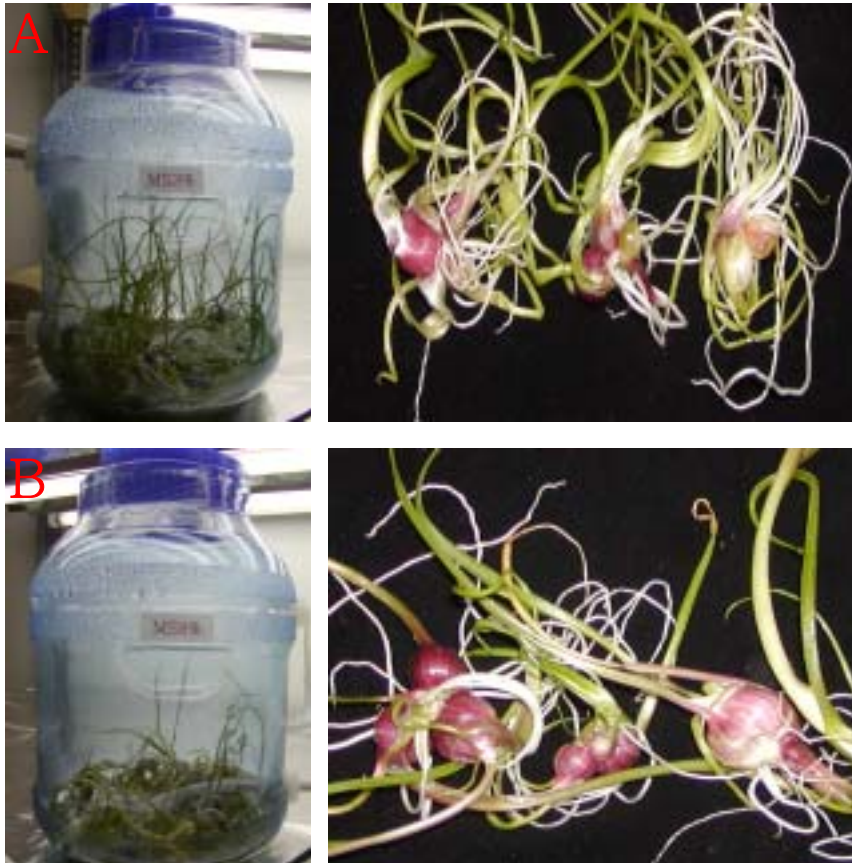


Fig. 48. Sucrose의 농도처리가 tank 액체배양에서 형성된 마늘 bulb의 구비대 생장 비교

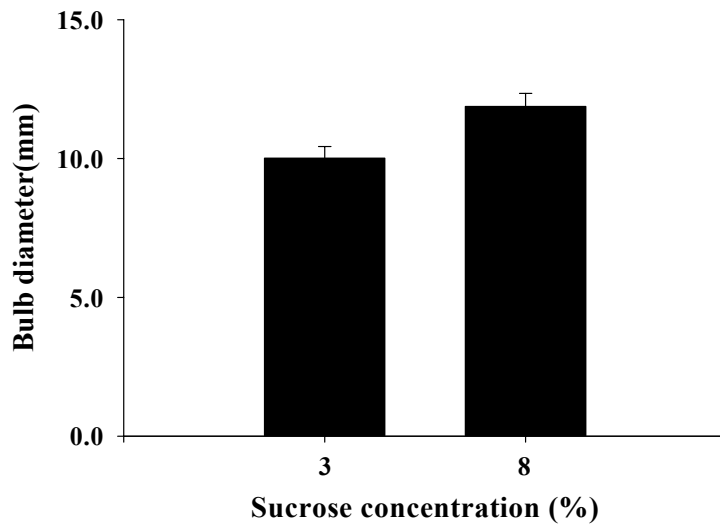


Fig. 49. Sucrose의 농도처리가 tank 액체배양에서 형성된 마늘 bulb의 미치는 영향.

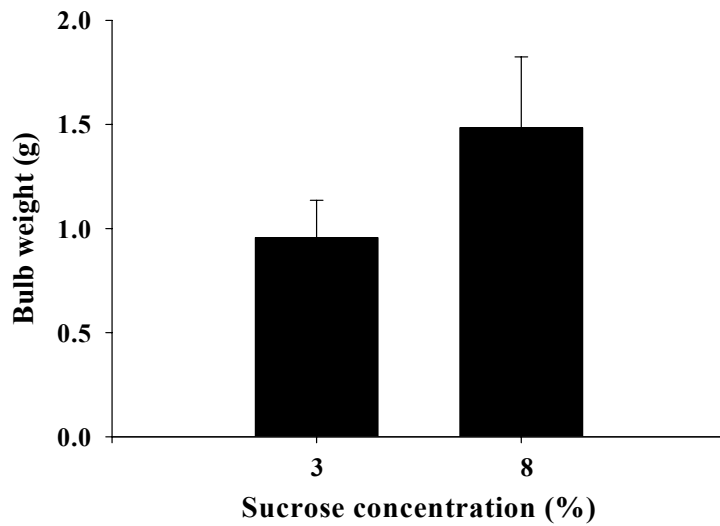


Fig. 50. Sucrose의 농도처리가 tank 액체배양에서 형성된 마늘의 bulb의 생체중에 미치는 영향.

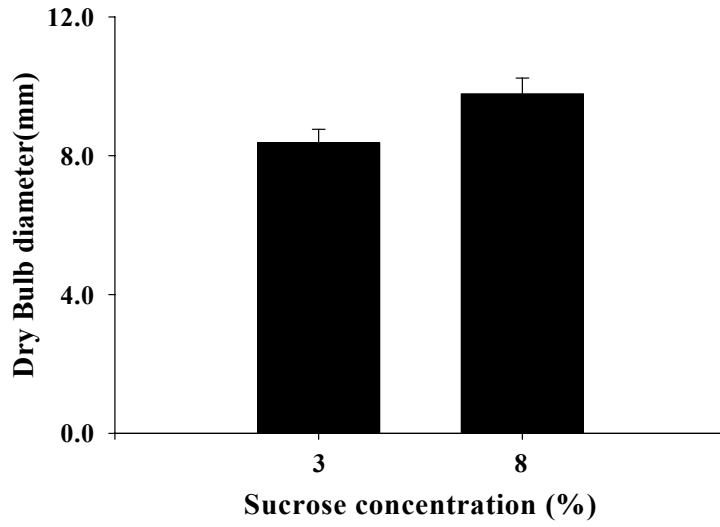


Fig. 51. Sucrose의 농도처리가 tank 액체배양시 생산된 bulb의 1개월 풍건 인경구의 직경에 미치는 영향.

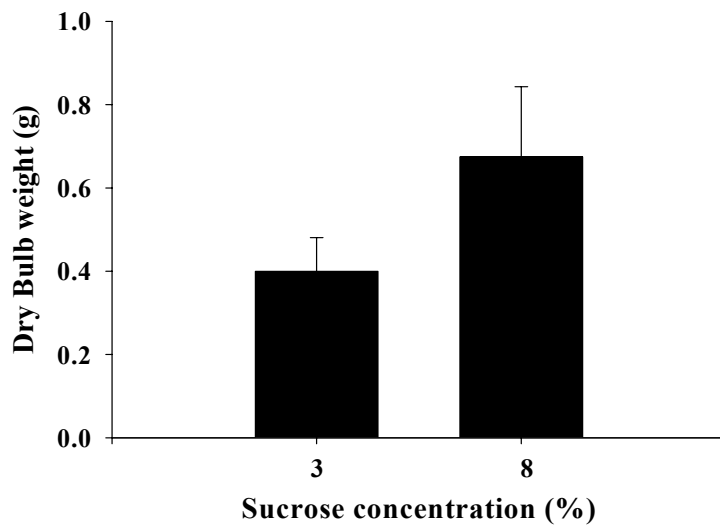


Fig. 52. Sucrose의 농도처리가 tank 액체배양시 생산된 bulb의 1개월 풍건 인경구의 건물중에 미치는 영향.

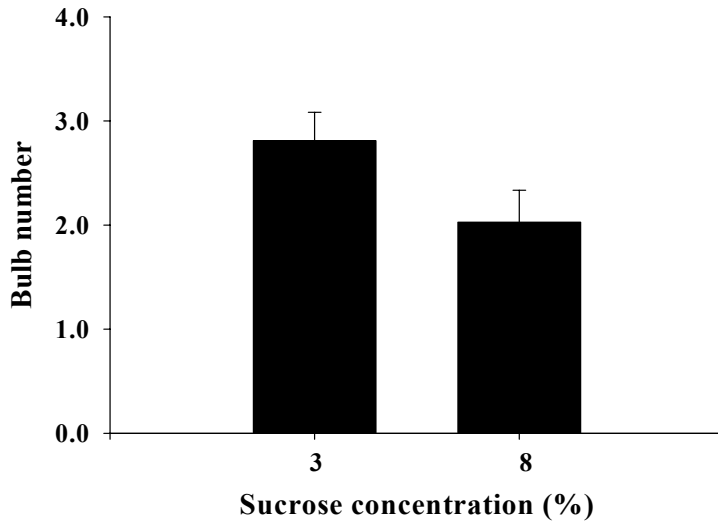


Fig. 53. Sucrose의 농도가 tank 액체배양시 bulb의 분화수에 미치는 영향.

8) 성장점 배양기간 중 성장조절물질의 첨가에 따른 구비대

마늘의 초기 성장점 배양시 성장조절물질의 처리가 구비대에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기본 MS고체배지와 2iP 2.0 + IAA 0.2mg · L⁻¹을 첨가한 배지에서 성장점을 각각 2개월 동안 배양한 후 tank로 옮겨 기본 MS액체배지에서 25℃, 16시간 일장으로 45일동안 배양하였다.

Fig. 54에서와 같이 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS배지에서 2개월 동안 배양한 후 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS액체배지의 tank로 옮겨 45일 동안 배양한 처리구 (A)에 비해 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS배지에 2iP 2.0mg · L⁻¹과 IAA 0.2mg · L⁻¹을 첨가한 배지에서 2개월 동안 배양한 후 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS액체배지의 tank로 옮겨 45일 동안 배양한 처리구(B)에서 직경이 더 양호하였고 구중에 있어서도 Fig. 55에서와 같이 A처리보다 B처리구에서 약 3배정도의 현저히 양호한 효과를 볼 수 있었다. 전체적인 생육에 있어서도 A처리보다 B처리에서 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 56). 따라서 구비대에 있어서 마늘의 초기 성장점 배양시 기본 MS고체배지에 성장조절물질 2iP 2.0mg · L⁻¹과 IAA 0.2mg · L⁻¹을 첨가하여 배양하는 것이 우량종구로서의 bulb 생산에 큰 효과를 볼 수 있으리라 사료된다.

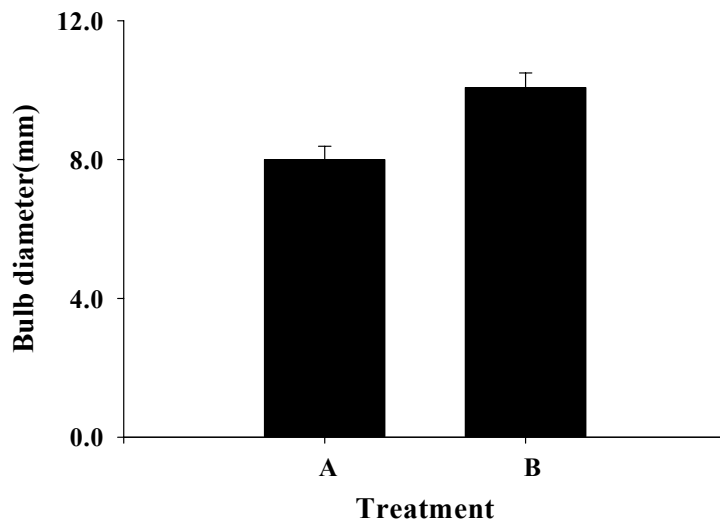


Fig. 54. 초기 성장점 배양시 성장조절물질이 생산된 bulb의 직경에 미치는 영향.
 A, Control; B, 2iP 2.0mg · L⁻¹ + IAA 0.2mg · L⁻¹

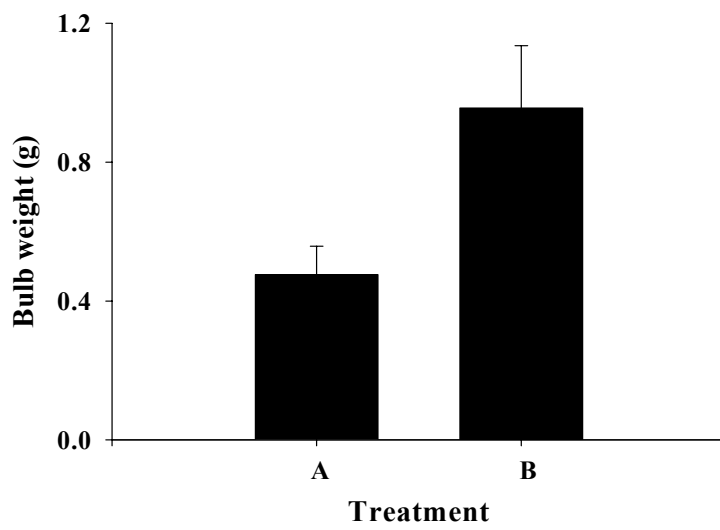


Fig. 55. 초기 성장점 배양시 성장조절물질이 생산된 bulb의 구중에 미치는 영향.
 A, Control; B, 2iP 2.0mg · L⁻¹ + IAA 0.2mg · L⁻¹

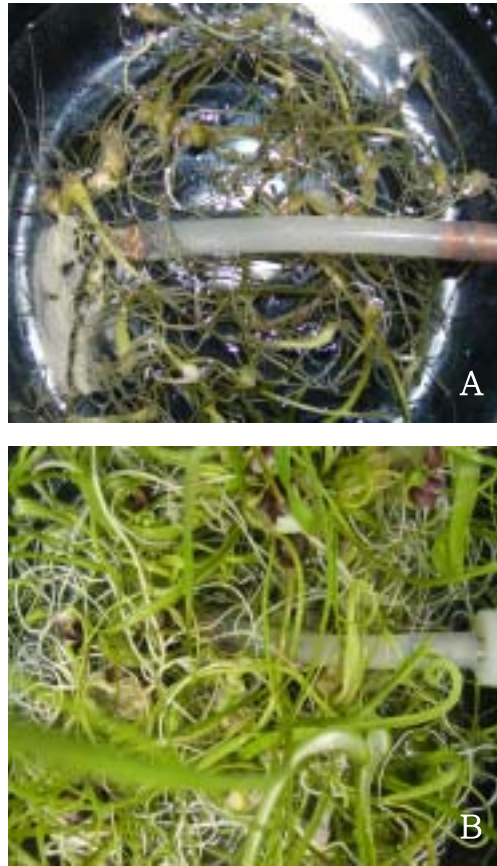


Fig. 56. 초기 생장점 배양시 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS배지에서 2개월 배양한 후 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS액체배지의 tank로 옮겨 45일간 배양한 마늘(A)과 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS액체배지에 $2iP\ 2.0mg \cdot L^{-1}$ 과 $IAA\ 0.2mg \cdot L^{-1}$ 을 첨가한 배지에서 2개월 배양한 후 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS액체배지의 tank로 옮겨 45일간 배양한 마늘(B).

9) 액체 tank배양을 통한 multiple-bulb 생산

이전까지의 각 실험에서 얻어진 효과적인 결과를 토대로 하여 구비대 실험을 하였다. 마늘의 성장점을 기본 MS고체배지에 multiple-shoot 유도조건인 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA를 처리하고 성장점을 치상하여 2개월동안 배양하여 multiple-shoot 유도한 후 3개씩 한개체가 되도록 실험재료로 준비하였다. 구비대 시키기 위한 과정으로써 기본 MS 액체배지에 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 BA와 $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 NAA를 복합처리하였고, 세포분열을 촉진하는 효과가 있는 ascorbic acid $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 단독처리하여 tank로 옮겨 각각 25°C , 16시간 일장으로 45일간 배양하여 bulb의 직경과 구중, 건조시킨 후의 직경, 구중, 수량을 조사하였다.

Fig. 57에서와 같이 대조구 무처리구(A)에 비해서 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 BA와 $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 NAA를 복합처리구(B)에서 다소 양호하였고 ascorbic acid $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 단독처리구(C)에서는 매우 저조하였다. 실질적으로 Fig. 58에서와 같이 multiple-bulb의 직경에 있어서는 대조구인 무처리구에 비해서 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA의 복합처리구에서 다소 양호하였고, ascorbic acid $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 단독처리구에서는 매우 저조하였다. 구중에 있어서는 Fig. 59에서와 같이 무처리구에 비해서 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA의 복합처리구도 차이가 없었으나 ascorbic acid $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 단독처리구에서는 매우 저조하였다. Fig. 60, Fig. 61에서 볼 수 있듯이 생산된 bulb를 1개월간 실내에서 풍건시킨 후 직경과 구중을 조사한 결과는 건조시키기 전과 같은 양상을 보였다. 그러나 최종적으로 생산된 bulb의 수량과 1개월간 풍건시킨 후의 bulb의 비대 형태를 비교할 경우 무처리구에서 가장 양호하였다.(Fig. 62, 63).

2005년도의 결과에서는, $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA의 복합처리구에 대한 효과가 인정되었으나, 본 실험에서는 그 효과가 인정되지 않은 것으로 보아 배양 용기에 따른 압력 및 밀도의 차이에 의한 영향이 있지 않았는가에 대한 고려도 해 볼 필요가 있다고 생각된다. 따라서 multiple-shoot 유도단계에서는 성장조절물질의 첨가에 대한 효과를 볼 수 있었으나 multiple-bulb의 생산단계에 있어서 구비대과정에서 성장조절물질의 첨가에 대한 효과는 크지 않으므로 유도단계에서는 성장조절물질을 첨가하고 비대단계에서는 첨가하지 않는 것이 보다 경제적이고 효율적인 방법이라 할 수 있다. 본 실험에서는, multiple-shoot의 유도단계에서는 sucrose 3%, $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2iP와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA를 처리한 MS고체배지에서 배양하여

multiple-shoot를 유도하였다. multiple-shoot가 분화된 후 이 multiple-shoot를 3개 단위로 분주하여 multiple-bulb의 생산단계로 tank배양으로 옮겼다. 이 때는 성장조절물질을 처리하지 않고 sucrose 3%를 첨가한 기본 MS액체배지에서 45일간 배양하여 충실한 multiple-bulb 생산해 낼 수 있는 최종적인 방안을 확인하였다.

10) 기내배양형성 소인경구의 포장적응성

2005년도 실험에서 생산된 muliti-bulb와 본 실험에서 생산된 muliti-bulb를 단구로 분리하여 포장적응성을 검토하였다. 2005년도에 생산된 단구는 건조시킨 후 직경 0.5~1.0, 1.0~1.5cm의 크기의 단구로 구분하여 원예용 상토를 이용하여 2005년 10월에 파종하여 2006년 6월에 수확하였고, 2006년도 의 3년차 실험에서 생산된 단구는 풍건시킨 후 무게를 측정하여 0~0.2g 미만, 0.2~0.4g 미만, 0.4~0.6g 미만 크기의 단구를 2006년 3월 파종하여 현재 생육이 진행 중에 있다.

Fig. 64에서 보는 바와 같이 생산된 단구를 적응성 실험을 거쳐 수확해 낸 결과 0.5~1.0cm의 구의 생육(A)이 1.0~1.5cm의 구의 생육(C)보다 더 양호한 결과를 보였다. 이 들은 통구와 3~4개의 분구로 분화되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4-B, D).

Fig. 65에서는 본 실험을 통하여 초기에 생산된 단구의 적응성 실험 현재 진행 중의 생육상태이다. 성장조절물질을 처리하지 않은 기본 MS배지에서 생산된 단구의 지상부 생육이 가장 저조함을 보였고, CCC $700\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에서도 무처리구보다는 양호하였지만 크게 차이가 나지는 않았다. 그러나 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 2ip와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IAA를 복합처리한 배지에서 생산된 단구의 생육은 현저히 양호하였다. 그러나 지하부의 생육이 양호한지에 대해서는 수확을 한 후 정확한 판단을 할 수 있을 것이다.

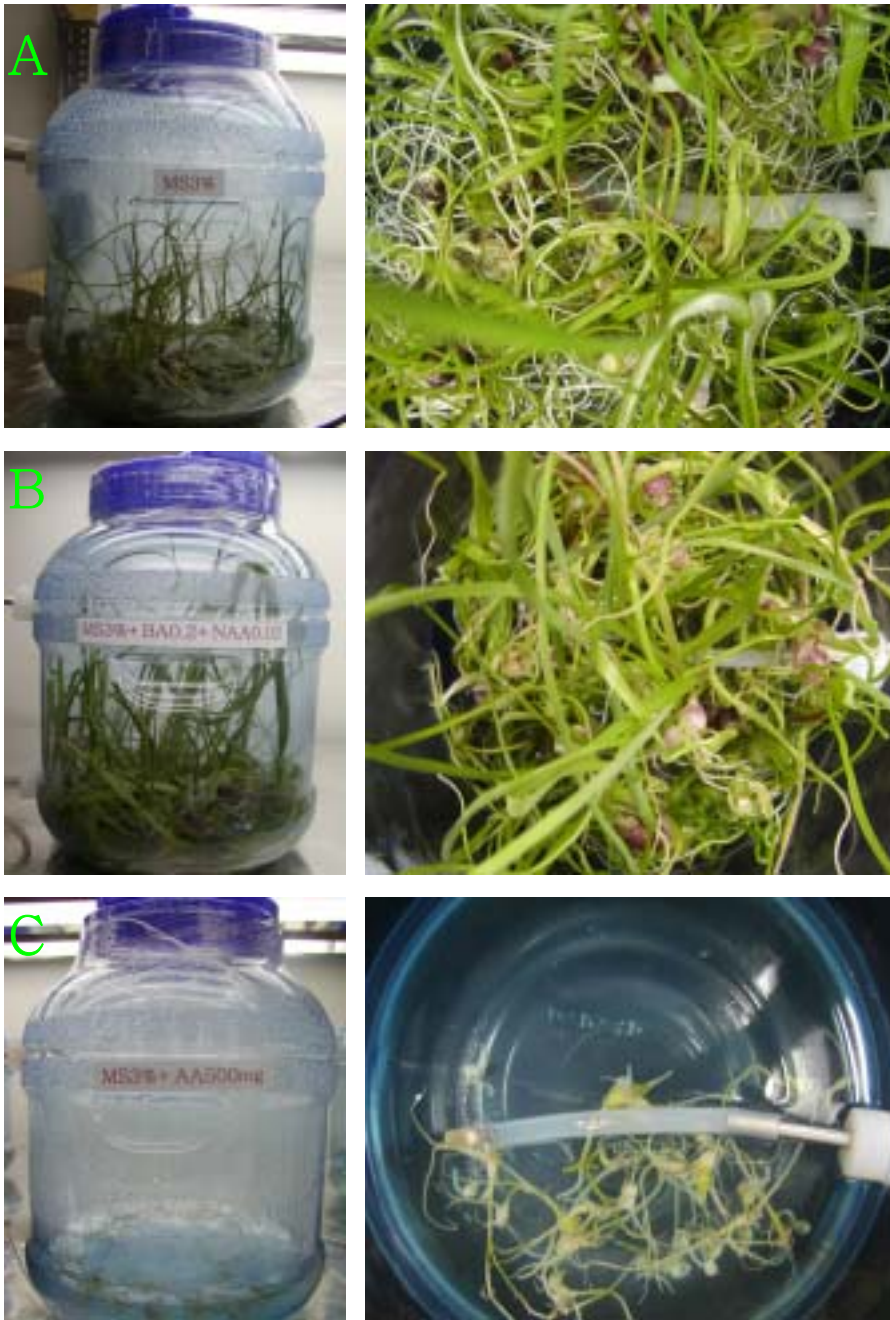


Fig. 57. BA, NAA 및 ascorbic acid의 첨가에 따른 multiple-bulb비대의 성장 비교

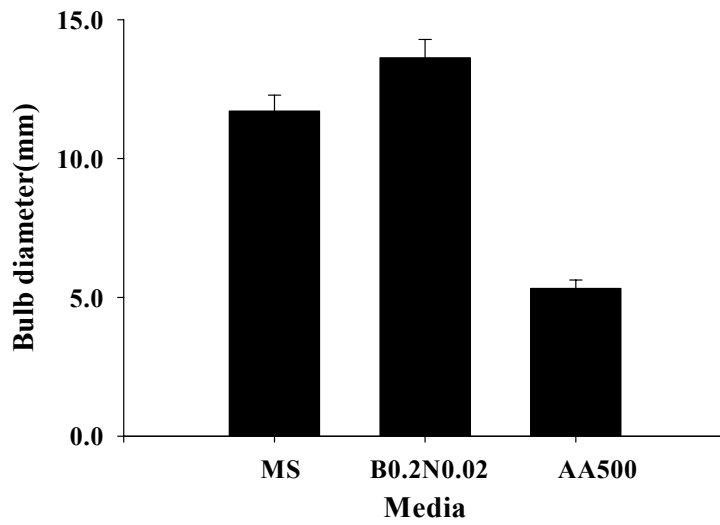


Fig. 58. BA, NAA 및 ascorbic acid의 첨가가 multiple-bulb의 직경에 미치는 영향

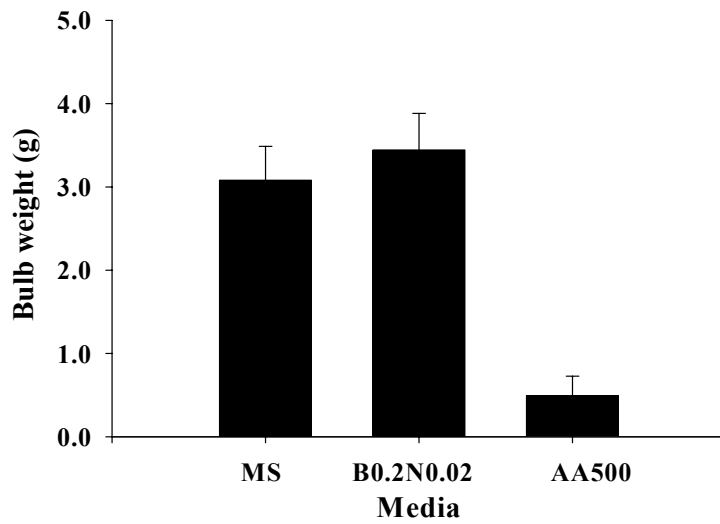


Fig. 59. BA, NAA 및 ascorbic acid의 첨가가 multiple-bulb의 무게에 미치는 영향

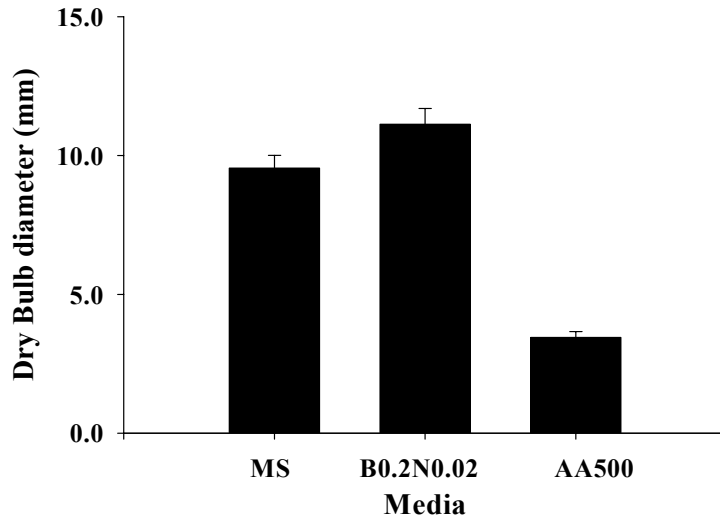


Fig. 60. BA, NAA 및 ascorbic acid의 첨가에 의해 생산된 multiple-bulb를 1달 동안 건조시킨 후 직경에 미치는 영향

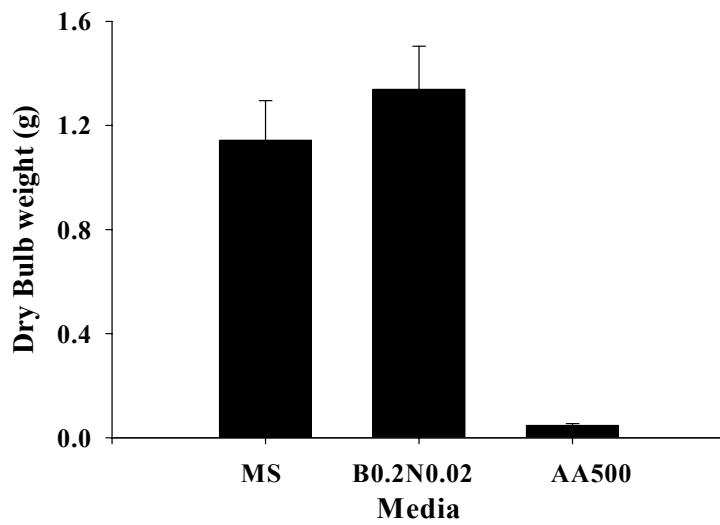


Fig. 61. BA, NAA 및 ascorbic acid의 첨가에 의해 생산된 multiple-bulb를 1달 동안 건조시킨 후 무게에 미치는 영향

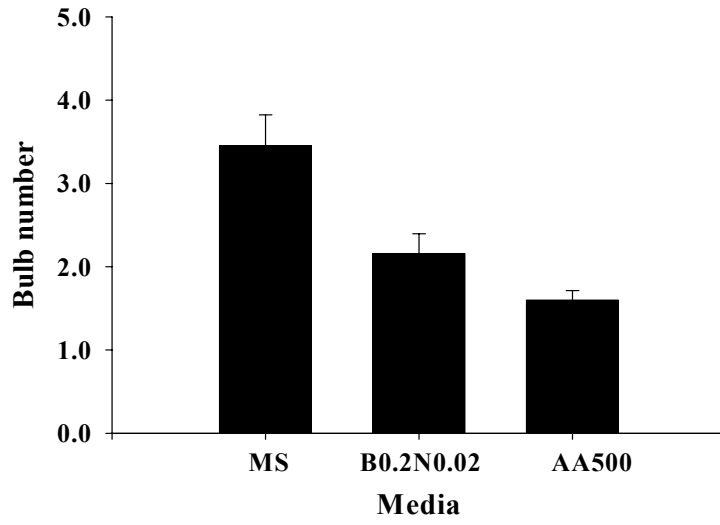


Fig. 62. BA, NAA 및 ascorbic acid의 첨가가 multiple-bulb의 수량에 미치는 영향

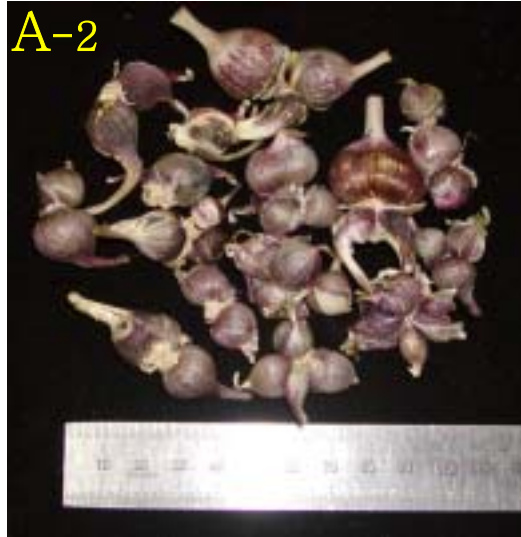
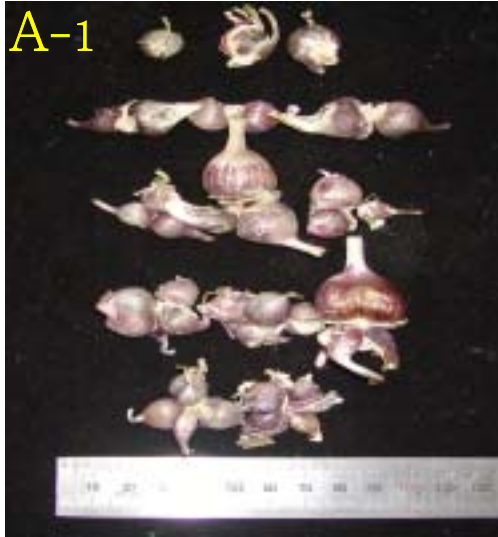


Fig. 63-1

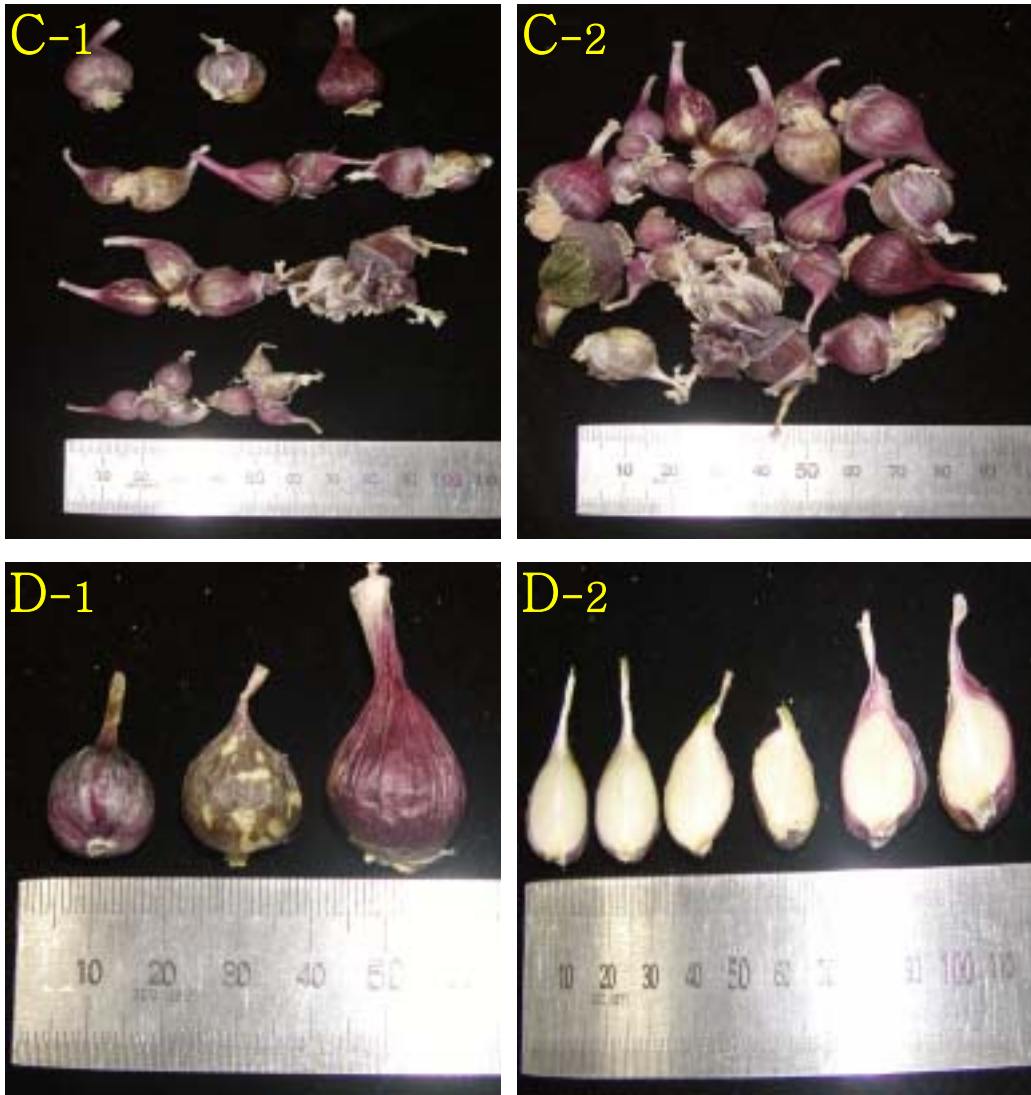


Fig. 63-2. 실험에 의해 생산된 multiple-bulb. MS 3%(A), MS 8%(B), MS 3% + BA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA(C)와 단면(D).

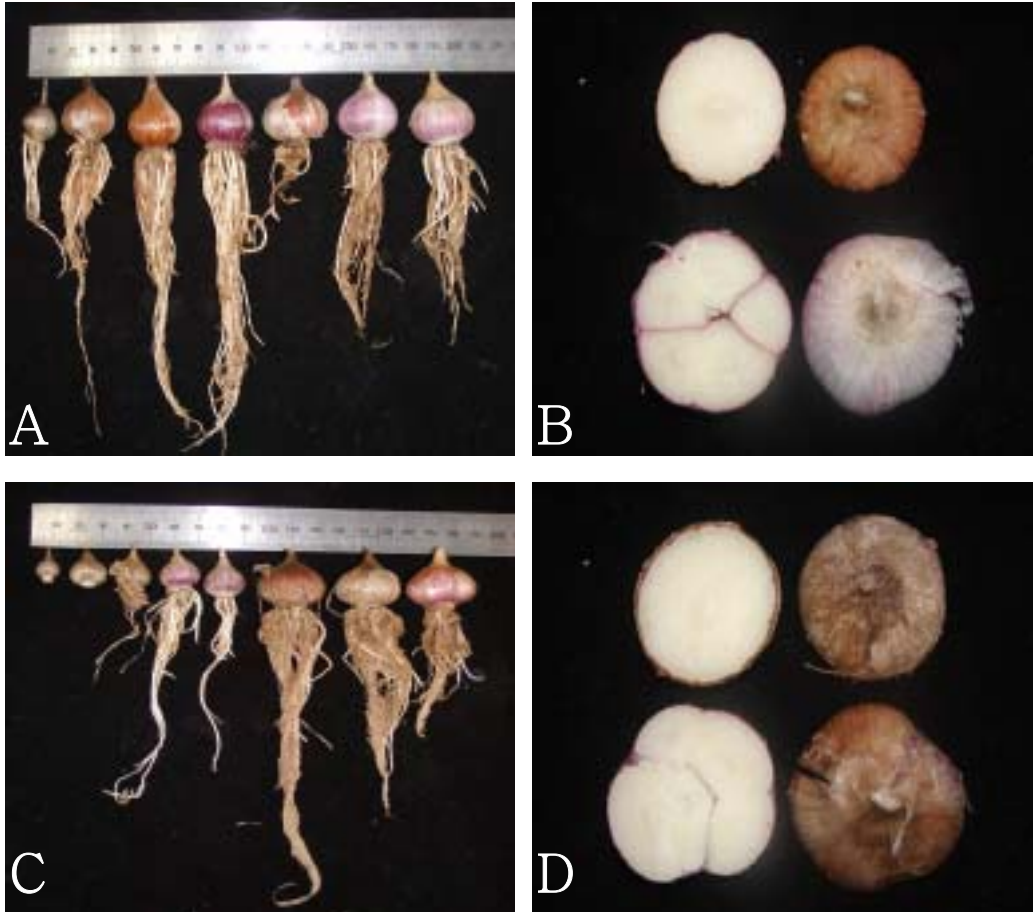


Fig. 64. 기내에서 생산된 단구를 직경 5-10mm(A)과 10-15mm(B)로 분리하여 flower box에 재식하여 수확된 마늘의 형태

표 3. 기내 성장점배양으로부터 형성된 단구의 구경별 생육 상황

재식단구구경 (mm)	구 고 (mm)	구 폭 (mm)	구 중 (g)
10 ~ 15	15.34	20.4	3.86
5 ~ 10	18.01	23.8	6.86

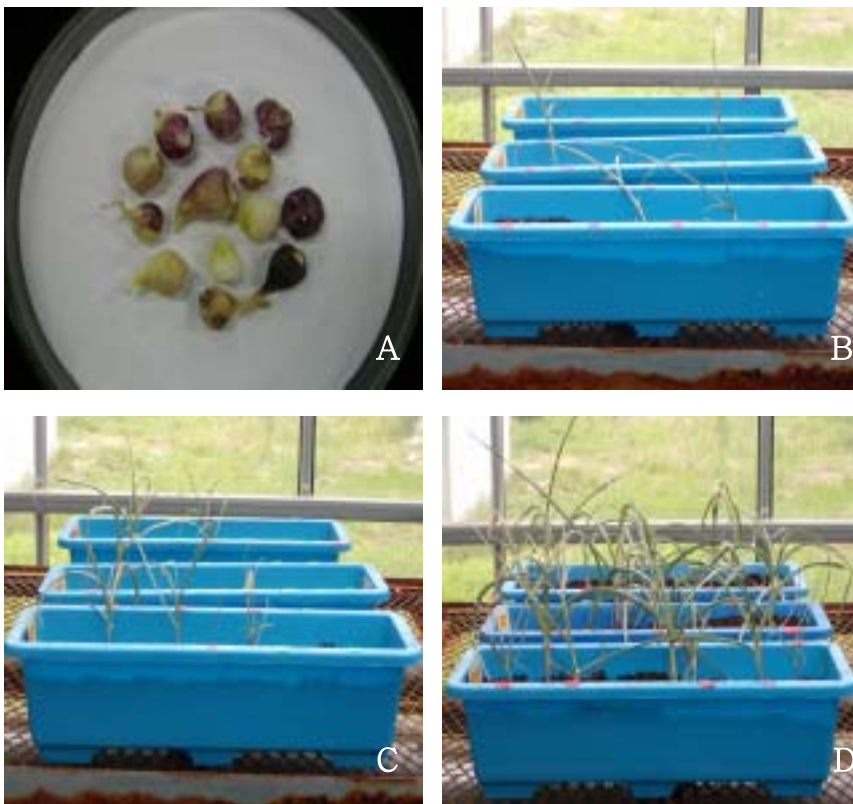


Fig. 65. 기내에서 성장조절물질 처리에 의해 생산된 bulb의 포장실험에 의한 마늘의 생육(본 실험) A : 처리한 0.2g의 단구, B : MS, C : MS + CCC 700mg · L⁻¹, D : MS + 2-iP 2.0mg · L⁻¹ + IAA 0.2mg · L⁻¹

2. 마늘 우량종묘의 포장 적응성 검증 및 농가 보급체계 확립(충남농업기술원)

가. 총포배양 유래 유식물체 순화를 위한 온실 재배조건 구명

1) 차광정도에 따른 생육

유식물체의 차광정도에 따른 생존율은 차광율에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았으나(Table 1, Fig. 1), 75% 차광 이상에서 도복이 발생하기 시작하였다. 초장의 변화도 Table 1에서와 같이 무차광이 16.0cm인 반면 차광율이 높아질 수록 초장은 신장되어, 75% 차광에서는 19.6cm에 달하였다. 엽수는 무차광이 1.6매인 반면 55%차광에서 2.3매로 가장 많았으며, 차광이 강할수록 엽수는 줄어들고 가늘어지는 현상이 나타났다.

형성된 구 크기를 보면 무차광보다 차광구에서 구고, 구경, 구중 모두 크고 무거웠으며 특히 55%차광에서 가장 좋았다.

Table 1. 차광정도별 생존율 도복율

차광율(%)	생존율(%)	도복율(%)
무차광	92.4	0
55%	98.4	0
75%	98.4	18.8
95%	96.9	35.9

Table 2. 순화 후 차광에 따른 생육 및 구 형성 정도

차광율(%)	초 장(cm)	엽 수(매/주)	구 고(mm)	구 경(mm)	구 중(g)
무차광	16.0	1.6	24.4	16.7	2.65
55%	16.4	2.3	25.9	17.8	3.59
75%	19.6	1.6	25.7	17.2	2.74
95%	19.6	1.5	27.8	17.6	3.40



Fig. 1. 차광처리 후 생육(무차광, 55%, 75%, 95%)

2) 순화용 적정 상토구명

원예용 상토와 혼합 상토(peatmoss+vermiculite+perlite)를 사용한 경우 생존율이 95.3, 96.9%로 높게 나타난 반면, peatmoss에 vermiculite나 황토를 혼합한 상토에서는 생존율이 70%대로 낮았다(Table 3, Fig. 2).

초장은 원예용상토가 가장 컸고 다음으로 peatmoss+vermiculite (50%:50%), peatmoss+vermiculite(35%:75%)가 컸다. 구형성 상태를 보면 구고, 구경, 구중 모두 peatmoss+vermiculite (50%:50%), peatmoss+vermiculite(35%:75%)에서 크고 무거웠고, 특히 peatmoss+vermiculite (50%:50%)처리한 것이 가장 좋았다. 그러나 생존율이 떨어져 앞으로 차광 등 다른 처리를 복합하여 이용하여 생존율을 높일 수 있는 방법도 함께 병행해야 할 것이다.

Table 3. 순화시 상토별 생존율 및 도복율

상 토	생존율(%)	도복율(%)
원예용상토	95.3	0
peatmoss+vermiculite+perlite (30%:40%:30%)	96.9	0
peatmoss+vermiculite(50%:50%)	78.1	0
peatmoss+vermiculite(35%:75%)	75.0	0
peatmoss+황토(50%:50%)	71.9	0

- 조사일 : 2003. 12. 16, 원예용상토(바로커상토)

Table 4. 순화시 상토별 생육 및 구형성 정도

상 토	초 장 (cm)	엽 수 (매/주)	구 고 (mm)	구 경 (mm)	구 중 (g)
원예용상토	17.8	1.5	23.5	15.3	2.1
peatmoss+vermiculite+perlite (30%:40%:30%)	16.5	1.8	23.9	16.5	2.7
peatmoss+vermiculite(50%:50%)	16.8	1.5	24.0	16.3	3.9
peatmoss+vermiculite(35%:75%)	15.7	1.7	22.7	15.4	3.5
peatmoss+황토(50%:50%)	11.1	0	24.4	16.5	2.5



Fig. 2. 상토별 생육광경

나. 마늘 총포배양에 의한 유식물체 대량증식

1) BA와 NAA 처리농도가 기관분화에 미치는 영향

BA 및 NAA를 복합 처리한 MS배지에 총포 미숙화기를 배양하여 생존율, shoot 분화, callus 형성, 유리화정도를 조사하였다. Table 5에서와 같이 초기 생존율은 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA와 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA처리구와 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA와 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 혼용처리구에서 95%로 가장 높게 나타났으나 성장조절물질의 처리농도 간 큰 차이는

없었다.

신초수는 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA와 NAA 혼용처리구 전체에서 신초수가 많았으며 특히 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA와 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 처리는 20.9개로 대조구의 11.3개에 비하여 185% 많았다. Callus형성은 무처리구에 비하여 생장조절물질 처리구에서 높은 경향이었으며 특히 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA와 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA처리에서 많이 나타났다. 또한 발근은 무처리와 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA와 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA처리구에서 발근이 약간 되었다. 유리화는 무처리구에 비하여 생장조절물질 처리구에서 높은 경향이였다.

Table 5. BA와 NAA 처리농도가 기관분화에 미치는 영향

생장조절물질($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		생존율 (%)	신초수 (개)	multiple-shoot	Callus 형성정도	발근 정도	유리화 정도
BA	NAA						
control		90	11.3	-	-	+(B)	-
0.5	0.1	90	15.8	+	+	-	+
	0.5	95	16.7	+	+	+	+
	1.0	85	16.4	+	+	-	++
1.0	0.1	90	20.0	++	+	-	+
	0.5	95	20.9	++	+	-	+
	1.0	90	20.6	++	++	-	+

^z- 거의 없음, + 약간, ++ 약간 많음

B : 구형태 형성

2) BA와 NAA 처리농도에 따른 계대배양 후 식물체분화

BA와 NAA 혼용처리한 액체배양에서 형성된 유식물체 덩어리를 절단하여 MS 기본배지에 1차 계대배양한 후 식물체 분화율을 조사한 결과는 Table 6과 같다. BA와 NAA 처리농도에 따른 신초수는 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA와 NAA 전체 혼용처리구에서 21.7~22.7개로 무처리구에 비하여 190~199% 정도 많았으며, 뿌리분화는 BA와 NAA 혼용처리구가 무처리구에 비해 뿌리 발달이 양호하였다. 또한 캘러스 형성도 무처리에 비하여 BA와 NAA 혼용처리구가 많았고, 발근 정도는 무처리가 좋은 편이었다. 유리화도 BA와 NAA 혼용처리구가 많았고 구형성은 대조구가 많은 편이었다.

Table 6. BA와 NAA 처리에 따른 계대배양 후 식물체 분화

생장조절물질(mg · L ⁻¹)		신초수 (개)	multiple - shoot	Callus 형성정도	발근 정도	유리화 정도	구형성 정도
BA	NAA						
	control	11.4	-	-	++	-	++
0.5	0.1	16.2	+	+	-	+	-
	0.5	19.4	+	+	+	+	+
	1.0	16.9	+	+	+	+	-
1.0	0.1	22.7	++	+	+	+	-
	0.5	21.7	+	+	+	+	-
	1.0	22.5	++	+	+	+	-

^z - 거의 없음, + 약간, ++ 약간 많음

다. 총포배양 유식물체에서 형성된 단구 포장 적응성 및 생산력 검정

총포 배양 유래 유식물체에서 형성된 단구에 대하여 포장 적응성을 검토코자 단구 무개별 생육상태를 조사한 결과 단구 무개별 생육 상황을 보면(Table 7, 8) 초장 과엽수 모두 단구 무개가 무거운 3.5g이상에서 크고 많았으며 2월13일에서 4월 3일까지의 초장은 크게 자라지 않았으나 엽수는 큰 증가를 보였다. 4월 3일부터 5월 23일까지의 생육은 초장의 변화가 커 크게 자란 것을 볼 수 있었으나 이와 반대로 엽수의 증가는 많지 않았다.

Table 7. 단구 무게별 초장의 변화

단구무게 (g)	초장(cm)		
	2월13일	4월3일	5월23일
3.5g 이상	20.4	26.3	59.0
1.6g ~ 3.4g	22.6	27.0	53.2
1.5g 이하	21.8	24.9	52.0

단구무게에 따른 생체중의 변화를 보면(Table 9) 정식된 단구무게가 무거울수록 생체중은 무거웠으며 특히 단구 무게가 1.5g이하인 처리구에서는 다른 처리구보다 생체중이 현저히 적어 생육이 떨어졌다.

이와 같은 경향은 주아재배시 주아의 무게가 증가할수록 출현율이 높아지고, 초장과 엽초장 모두 주아의 무게가 클수록 커지는 경향이 있다는 보고와(황, 김 등. 2006)같은 경향이였다. 그러나 이러한 것은 종구 크기에 따른 재식거리가 달라 질 수 있으므로 이에 대한 시험이 요구된다.

Table 8. 단구 무게별 엽수의 변화

단구무게 (g)	엽수(개/주)		
	2월13일	4월3일	5월23일
3.5g 이상	3.1	6.5	7.7
1.6g ~ 3.4g	2.9	6.5	7.6
1.5g 이하	2.6	5.7	7.3

Table 9. 단구 무게별 생체중의 변화

단구무게 (g)	생체중(g/개)		
	2월13일	4월3일	5월23일
3.5g 이상	7.6	14.7	24.3
1.6g ~ 3.4g	4.2	11.3	21.0
1.5g 이하	2.4	8.0	16.8

Table 10. 기내자구 단구무게에 따른 수량성

단구무게 (g)	구 폭 (mm)	구 고 (mm)	구 중 (g/개)
3.5g 이상	23.6	26.2	7.8
1.6g ~ 3.4g	23.3	26.1	7.6
1.5g 이하	20.6	24.1	6.5

단구무게에 따른 수량을 조사한 결과 Table 10과 같이 구폭과 구고는 구중이 1.6g이상 정직한 처리구는 비슷한 크기였으나 1.5g이하 파종구는 생육이 저조 한 경향이였다. 구중 또한 지상부 생육과 같은 경향이였다.

라. 기내 유식물체 순화 조건 구명

1) 적정상토 선발

유식물체의 순화용 상토로서 피트모스, 질석, 펠라이트, 발흙, 활성탄, 원예용상토를 이용하여 이들을 혼용 및 단용으로 하여 처리한 결과(Table. 11) 초장은 9.2~10cm 내외로 처리 간 차이가 크지 않았다.

그러나 엽수 및 생체중, 건물중 모두 혼합상토 Hort50%:Per50%(1:1) 및 Pe30%:Ve20%:Per30%:So20%를 사용한 처리구에서 엽수가 많고, 무개도 무거워 생육이 다른 처리구에 비하여 좋았다. 그러나 뿌리의 수는 처리간 차이가 없었고, 근장의 경우 Hort50%:Per50%(1:1)처리에서 22.7cm로 가장 긴편 이었다. 이것은 원예용상토와 펠라이트 혼용시 지하부의 공극형성이 가장 적당한 조건이라 생각되었으며, 이조성은 생체중이나 건물중이 양호하고 지상부 생육이 좋은 처리인 Pe30%:Ve20%:Per30%:So20%를 사용하는 것과 같이 순화용 상토로 적합할 것으로 예상된다.

Table 11. 순화시 상토별 생육 상황

상 토	초 장 (cm)	엽수 (개)	생체중 (g)	건물중 (g)	근장 (cm)	근수 (개)
Hort	9.2	3.3	0.98	0.13	19.9	15.2
Hort50%:Per50%(1:1)	9.7	3.6	1.02	0.15	22.7	15.3
Pe30%:Ve20%:Per30%:So20%	9.0	3.5	1.00	0.18	18.6	14.5
Pe30%:Ve20%:Per30%:So15%:Ha5%	10.0	3.3	0.74	0.13	20.6	14.2
Pe30%:Ve40%:Per30%	9.5	3.3	0.97	0.14	19.6	15.3

- Hort : 원예용상토, Per : 펄라이트, Pe : 피트모스, Ve : 버미큘라이트,
발흙 : So, 활성탄 : Ha
- 조사일 : 2005. 1. 21, 원예용상토(바로커상토)

순화시 상토별 초장은 시기별 조사결과는 Table 12와 같다. 일차조사 후 약 90일 이 지난 4월 18일에 조사한 결과 Hort50% : Per50%(1:1) 및 Pe30% : Ve20% : Per30% : So20% 처리에서 각각 44.1 및 46.3cm로 다른 처리보다 초장이 컸다. 이것은 Table 11의 조사결과와 같이 생체중 및 건물중이 좋았던 것이 중후기 생육에 영향을 주었음을 알 수 있었다.

육묘시 시기별 상토 구성에 따른 초장조사 결과는 Table 13과 같다. 일차조사 후 60일 및 90일 후 조사결과 60일 후 부터는 엽수가 크게 변화하지 않았고 4월 18일에 조사한 결과 초장과 같이 Hort50% : Per50%(1:1) 및 Pe30% : Ve20% : Per30% : So20% 처리에서 각각 4.7개 및 5.0개로 다른 처리보다 엽수가 많았다.

Table 12. 육묘시 상토별 초장 변화 (단위 : cm)

상 토	1월21일	3월16일	4월18일	평균
Hort	9.2	16.2	42.9	22.8
Hort50%:Per50%(1:1)	9.7	15.0	44.1	22.9
Pe30%:Ve20%:Per30%:So20%	9.0	16.2	46.3	23.8
Pe30%:Ve20%:Per30%:So15% :Ha5%	10.0	18.2	39.9	22.7
Pe30%:Ve40%:Per30%	9.5	15.7	35.9	20.4

- Hort : 원예용상토, Per : 펄라이트, Pe : 피트모스, Ve : 버미큘라이트,
발흙 : So, 활성탄 : Ha

Table 13. 육묘시 상토별 엽수 변화

상 토	엽수(개/주)			
	1월21일	3월16일	4월18일	평균
Hort	3.3	4.6	4.6	4.2
Hort50%:Per50%(1:1)	3.6	4.4	4.7	4.2
Pe30%:Ve20%:Per30%:So20%	3.5	4.4	5.0	4.3
Pe30%:Ve20%:Per30%:So15% :Ha5%	3.3	4.5	4.5	4.1
Pe30%:Ve40%:Per30%	3.3	4.5	4.5	4.1

- Hort : 원예용상토, Per : 펠라이트, Pe : 피트모스, Ve : 버미큘라이트, 발흙 : So, 활성탄 : Ha

마. 기내자구 저장조건에 따른 생육 및 수량성 비교

기내자구 저장 조건에 따른 생육상황은 Table 14와 같이 처리간 큰차이는 없었으나, 4℃처리에서 생육이 양호한 경향을 보였고 생체중 역시 4℃처리에서 가장 좋았으며, 10℃처리구에서는 다른 처리에 비하여 상당히 생육이 억제된 경향을 볼 수 있었다.

Table 14. 저장 조건에 따른 생육

저장온도	초장 (cm)	엽 수 (개/주)	생체중 (g/주)
4℃	42.5	6.2	6.7
7℃	40.5	6.0	6.1
10℃	40.5	5.9	5.9

※ 조사일: 2006. 6. 13일

수량은 Table 15와 같이 4℃, 7℃에서 구폭, 구고 모두 컸으며 특히 4℃처리구에서 가장 컸다. 구중 또한 같은 경향으로서 4℃에서 가장 무거워, 단구 저장시 4℃저장하는 것이 좋을 것이라 생각 된다.

바. 무병종구 년차별 바이러스 이병을 조사

년차별 바이러스 이병을 조사하기 위하여 재배한 결과 Table 16과 같이 초장, 엽수, 생체중 모두 기내자구 1년차 종구는 생육이 2, 3년차에 비하여 상당히 떨어지는 경향을 보였으며, 2년차 단구는 3년차 인편과 생육이 비슷한 경향을 보였다.

바이러스 검정결과 Table 17과 같이 마늘에서 자주 발생하는 OYDV, Potyvirus group, TMV 모두 나타나지 않았다.

Table 15. 저장 조건에 따른 수량성

저장온도	구 폭 (cm)	구 고 (cm)	구 중 (g/개)
4℃	26.1	28.2	7.9
7℃	24.3	27.3	7.2
10℃	22.8	24.6	6.4

※ 조사일: 2006. 6. 13일

Table. 16. 무병종구 년차별 생육 상황

구 분	초장 (cm)	엽 수 (개/주)	생체중 (g)
기내자구(1년차)	34.3	5.9	7.2
단 구(2년차)	52.1	7.8	17.2
인 편(3년차)	53.2	7.9	17.5

※ 조사일: 2006. 5. 10일

Table 17. 바이러스 검정 결과

구분	OYDV	Potyvirus group	TMV
기내자구(1년차)	- ^z	-	-
단 구(2년차)	-	-	-
인 편(3년차)	-	-	-

※ 조사일: 2006. 5. 10일

^z-: negative반응

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 마늘 우량종묘의 기내급속 대량증식

1) 마늘의 무병우량종구의 생산을 위한 경정배양에서 분화된 유식물체의 생체중이나 엽수 모두 재료를 4℃에서 1개월간 저장했던 저온처리구가 대조구인 실온저장구에 비해 양호하였다. 저온처리구의 8% sucrose 배양구에서는 엽수의 분화가 현저하게 많았으며, 생체중이나 다신초 분화의 효과가 장일조건 하에서, 다신초의 분화나 bulb의 형성의 종합적으로는 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹구가 효과적이었다.

2) 배양전 종구를 4℃에서 각각 30, 40, 50, 60일 동안 저장한 후, 20℃와 25℃의 두 처리구를 설정하고 8시간과 16시간의 장일로 배양하였을 때, 40일 이상의 저장구에서 shoot, bulb 발생이 현저히 양호했다. 30일간이나 40일간의 저장의 경우 20℃/8시간 단일에서 양호하였으나, 50일 저장에서는 20℃/16시간 장일, 60일의 경우에는 25℃/16시간 장일처리에서 shoot와 bulb의 발생이 양호하게 나타났다.

3) 성장점배양에서 당은 식물체의 전분축적을 위한 중요한 탄수화물 급원이기 때문에 shoot형성과 bulb의 비대에 필수적 요소라 할 수 있다. 30일간의 초기단계에서는 shoot 발생이나 기내구 형성 모두 sucrose 3%가 8% 보다 양호하였다.

광질의 효과는 60일간의 배양에서 8% sucrose배지에서는 적색광 하에서의 kinetin 2 +NAA 0.2mg · L⁻¹구가 shoot 및 bulb의 형성이 매우 양호한 결과를 보였다. 그러나 3% sucrose배지에서는 청색광하에서의 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹구에서 양호하였다.

4) Sucrose 3%가 첨가된 기본 MS배지에 성장점배양개시 30일 경과 후의 shoot와 bulb 형성에는 BA + NAA처리에 비해 kinetin + IAA의 효과가 양호하였고, multiple-shoot의 분화유도에는 kinetin보다 2iP의 효과가 양호하였다.

5) 고체배지배양보다 대형화의 가능성이 있는 생물반응기배양이나 tank배양 시스템을 개발하여 실용화하고자 하였다.

5L 생물반응기에서 배양할 경우 생육 및 분화가 매우 왕성하였다. 다만 BA 2 + NAA 0.2의 비교적 성장조절물질의 농도가 높았던 LS배지의 경우에는 MS배지에 비해 신초의 생육이 비정상적이거나 수침상으로 고사하는 경우가 많이 나타났다. BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹의 처리구에서는 MS배지나 LS배지 어느 경우에서나 생육이 양호하였지만 MS배지의 경우에는 발근 상태가 양호하였고, 인경구의 분화가 가시적으로 나타났다. LS배지의 경우에는 지상부의 발육은 보다 양호하였으나 발근이나 인경구의 분화는 MS배지에 비해 저조하였다.

성장조절물질을 첨가하지 않은 배지에서는 MS배지나 LS배지경우에서는 발근상태가 뚜렷하게 양호하였고 인경구의 분화는 현저하였다. 특히 MS배지에서는 거의 모든 이식체에서 직경 7 mm 이상의 비교적 대형의 인경구가 분화되어 토양이식에 충분할 정도의 소인경구를 단기간에 획득할 수가 있었다.

6) 따라서 생물반응기의 이용은 단기간에 우량한 소인경구의 획득의 가능성 배양액의 교체가 용이하기 때문에, 초기 2개월에는 BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹배지에서 배양을 한 후 중반 이후에 성장조절물질이 포함되지 않은 MS배지로 옮겨 약 45일간 계대배양을 할 경우 대형의 소인경구를 단기간에 생산할 수 있었다. 3% 이하의 적은 양의 당을 사용해서 2개월 이내의 단기간에 multiple-shoot와 실용 가능한 bulb의 비대를 증진시킬 수 있는 방법이 바람직하고 또 가능성도 충분하였다.

7) 성장점으로부터 분화된 multiple-shoot를 가지고 tank배양으로 bulb를 대량생산하기 위한 방안으로 15L 시판용 생수통을 이용하였다.

성장점을 sucrose 3%의 MS고체배지에 치상한 후 25℃, 16시간의 일장으로 30일 동안 배양한 후, sucrose 8%가 첨가된 액체배지에 옮겨 tank 배양을 실시하였다. BA 0.2 + NAA 0.02mg · L⁻¹처리구에서 생체중, 근중, 구중이 양호했다. BA를 0.2mg · L⁻¹으로 고정시켰을 때, NAA 농도가 증가할 수록 생육이 현저하게 저하되고 구의 비대가 이루어지지 않았다. multiple-shoot 유도조건이었던 kinetin 4.0 + IAA 0.2mg · L⁻¹처리구에서는 bulb가 형성되는 기부부위에 심한 callus와 유리화 현상이 생기며 고체배지에서 유도된 multiple-shoot가 bulb로 비대되지 않는 못하는 경우가 많았다. 따라서 구비대에 있어서 마늘의 초기 성장점 배양시 2iP 2.0mg · L⁻¹ + IAA 0.2mg · L⁻¹에서 첨가하여 배양하는 것이 우량종구로의 bulb 생산에 효과적이었다.

구비대 단계에서 계대이식하는 shoot의 상태를 날개, 3개 다발, 5개 다발로 분리

하여 25℃, 16시간 일장으로 45일간 배양한 결과, 3개체 다발에서 평균 2.5개의 양질의 bulb를 생산해 낼 수 있었다

CCC 700mg · L⁻¹처리구에서는 대조구에 비해 외피부위가 자색이나 황색으로 착색되면서 multiple-bulb로 비대되는 것을 뚜렷하게 볼 수 있었으나, callus화에 의한 bulb의 손실이 많았다. 또한 ascorbic acid 500mg · L⁻¹처리구에서도 구비대는 매우 저조하였다.

8) 성장점을 2개월 동안 배양하여 multiple-shoot를 유도한 후, 3개씩 한 덩어리가 되도록 shoot를 분리하여 시판용 10L tank의 기본 MS액체배지에 옮겨 25℃, 16시간 일장으로 45일간 배양한 결과, 기내구의 생체직경과 생체중, 풍건시킨 후의 직경과 무게가 8%의 sucrose 첨가한 조건에서 약간 양호하였다. 그러나 최종적으로 생산된 bulb의 수량에 있어서는 sucrose 3% 첨가조건에서 양호한 효과를 보였다.

9) 실험에서 생산된 muliti-bulb를 단구로 분리하여 건조시킨 후 직경 0.5~1.0, 1.0~1.5cm의 크기 포장적응성을 검토한 결과, 직경 0.5~1.0cm의 구의 생육이 1.0~1.5cm구 보다 더 양호한 결과를 보였다. 이 들은 통구와 3~4개 인편의 마늘로 분화된 것들이 많았다.

2. 마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급체계 확립

1) 마늘 유식물체 대량증식을위한 총포배양시 BA 1.0mg · L⁻¹와 NAA 0.5mg · L⁻¹처리가 초기 생존율과 신초유도에 유리 하였으며, BA와 NAA의 처리농도에 따른 계대배양 후 식물체분화처리에서 BA 1.0mg · L⁻¹와 NAA 전체 혼용처리구에서 신초수가 많았다.

2) 마늘 우량종묘의 포장 적응성 검정 및 농가 보급 체계 확립을 위하여 기내배양묘의 순화 조건 및 저장조건, 포장 생산력 검정을 수행한 결과, 총포배양 유래 유식물체 순화를 위한 재배조건 중 차광은 흑색 차광망 55% 가 가장 좋았고, 순화 상토는 지상부생육이 양호하였던 피트모스 : 버미큘라이트:펠라이트:발흙을 30:20:30:20의

비율로 혼합한 경우가 가장 유리하였다.

3) 총포 유식물체에서 형성된 단구의 포장 적응성은 3.5g이상 > 1.6g ~ 3.4g > 1.5g 이하의 순으로 초장, 엽수, 경경 등 생육이 좋았다

4) 기내소구는 4℃저장 후 재배하는 것이 생육 및 수량 모두 양호 하였다.

5) 무병종구 년차별 생육상황은 2, 3년차에서 생육이 좋았고, 년차별 바이러스 이병 조사 결과 OYDV, Potyvirus group, TMV 모두 이병되지 않았다.

본 연구에서는, 마늘의 생장점배양을 통하여 무병우량종구의 생산을 효율적으로 달성하기 위하여 3년간에 걸쳐 종합적인 실험을 수행하여 상기와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

기내배양을 통하여 마늘의 대량증식과 구형성을 동시에 충족시키는 방법의 도입은 생리적 특성상 어려운 문제라고 판단된다. 따라서 증식과 비대 생육상을 구분하는 '2단계 배양시스템'의 도입을 모색하였다. 이올러 배양형태에 있어서도 식물체의 발탈관계를 고려하면서 대량생산의 공정도입을 모색하여 'tank배양시스템'의 형태를 도입하게 되었고, 이들 방법의 동시 도입으로 실용화가 가능한 매우 효과적인 결과를 얻을 수 있게 되었다.

'2단계 배양시스템'으로는 'multiple-shoot 유도단계'와 'multiple-bulb 생산단계'를 설정하였다. 1차 과정으로서의 Multiple-shoot 유도단계에서는 sucrose 3%, 2.0mg · L⁻¹의 2iP와 0.2mg · L⁻¹의 IAA를 처리한 MS고체배지에서 배양하여 multiple-shoot를 유도하였다. multiple-shoot가 분화된 후, 이 multiple-shoot를 3개의 shoot를 1개 단위로 분리하여 multiple-bulb 생산단계인 tank배양으로 옮겨 계대배양을 하였다. 이 단계의 배양에서는는 성장조절물질을 처리하지 않고 sucrose 3%만 첨가한 기본 MS액체배지에서 45일간 배양하여 충실한 multiple-bulb 생산해 낼 수 있었다. 이와 같은 2단계 배양시스템의 도입과 tank배양시스템의 도입으로 사용가능한 기내구를 총 4개월 이내에 대량으로 생산해 낼 수 있는 체계를 확립하였고, 동시에 기내구의 생산을 대형화 또는 공장생산체계로 확대할 수 있는 기틀이 수

립되었다.

또한 포장에서의 증식을 위한 종구의 크기는 직경 10 mm내외의 크기면 충분한 것으로 판명되었다. 포장적응성에 대해서도 종구생산을 위한 체계가 확립된 상태로 실용화에도 충분히 경쟁력이 있다고 판단되었다.

이 들 방법의 도입은 시설비나 재료비의 과다한 소요가 요구되지 않으므로 지금까지의 마늘 무병우량종구 생산의 애로사항을 타파할 수 있는 기반이 형성되었다. 이 방법이나 기술은 매우 간편한 것으로 주산단지의 농업기술센터나 종묘업체로의 기술 이전에 의해 실용화시킬 수 있어 마늘 재배농가의 소득증대는 물론 국제경쟁력을 높이는데 기여할 수 있을 것으로 확신한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 국내 마늘산업에서 가장 문제점으로 대두되고 있는 무병우량종구의 농가보급을 목표로 하여 서산마늘의 생장점배양을 개시점으로 하여 포장실증실험까지 총체적으로 수행하였다.

그 결과 무병하면서 유용성이 있는 기내 종구를 대량으로 단기간에 생산할 수 있는 2단계법의 개발과, 또한 생산의 효율성의 증대를 위한 tank배양에 거론한 기초를 확립하였으며, 동시에 포장적응성까지 확인하였다. 이러한 결과가 서산, 단양, 의성 등과 같은 마늘의 중심지에 공급되어 기본이 될 것을 기대한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

대부분의 재배마늘은 응성불임이므로 종구를 이용한 영양번식을 하고 있기 때문에 바이러스에 감염될 확률이 100%에 가깝다. Dolores 등(2002)은 마늘에 감염되고 있는 바이러스에 관한 구체적인 연구를 수행해 왔다.

Virus-free한 마늘의 우량종구를 확보하기 위한 방법으로 현재까지 알려진 가장 효과적인 방법으로 생장점배양을 이용하고 있다. 이에 관한 연구는 Ayabe(2001), Chovelon 등(1990), Senula 등(2000)에 의해 구체적으로 소개되고 있다.

Barandiaran 등(1999), Haque 등(1997), Kahane 등(1992), Kim 등(2003), Myers와 Simon(1998), Nagakubo 등(1993), Robledo Paz 등(2000), Zheng 등(2003)과 같이 많은 연구자들에 의해 생장점배양에 의한 마늘의 대량증식에 관한 연구가 수행되어 왔으나 virus-free한 종구의 생산에 한계가 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 마늘의 경우에는 감자나 백합과 같이 기내배양에 의한 무병주의 대량생산이 효율적으로 실용화되고 있지 못하고 있어 현재도 대량증식의 방법모색에 주력하고 있다. 이러한 난점을 타개하기 위하여 Xu 등(1991)은 embryogenesis을 도입하고자 하였고, 최근 Fereol 등(2002, 2005)은 세포배양으로 증식시킨 후 smatic embryogenesis과정으로 대량증식을 도모하였다. 그러나 이와 같은 연구는 현재단계에서는 실용화시키기 위해서는 일정한 준비과정과 기술의 보편화가 수반되어야 할 뿐 아니라 경제성 문제도 고려해야 할 단계이다. 따라서 현재까지는 실용화를 높이기 위하여는 주로 배지조성 즉 배지의 종류, 생장조절물질의 종류와 농도, sucrose의 농도, 배양형태, 일장처리, 저온처리 등에 관하여 연구가 이루어지고 있는 실정인데 이에 관한 종합적인 체계가 보편화되어 있지 않기 때문이다. 생장조절물질의 효과에 있어서도 cytokinin의 경우 BA, kinetin, 2iP의 효과가 서로 다르게 나타나고 있기 때문이다. 다만 그 동안의 연구성과에 의해 10년 사이에 1개의 생장점으로부터 2개 미만의 증식 효과가 6-7개의 증식으로 발전해 온 것은 생장점배양에 의한 마늘의 무병주생산의 가능성을 암시하고 있는 것이다.

종합적으로 볼 때, 생장점배양으로부터 필요한 식물체를 대량으로 생산하기 위해서는 그 식물체의 생장곡선의 생리적 특성을 완전히 이해하고 생장에 영향을 줄 수 있는 요인의 제거와 함께 촉진요인을 동시에 부여할 필요가 있다.

마늘의 경우에도 생장과정에서 액아의 분화 및 생장과 구형성과의 관계는 생리적으로 상반된 요인에 의해 유발된다. 이 상반된 요인을 동시에 충족시키는 조건의 부여보다 2원적 배양형태의 도입이 보다 효과적일 수 있다고 판단된다.

제 7 장 참고문헌

1. Al-Zahim, M.A., Ford-Lloyd, B.V. and Newbury, H.J. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports* 18:473-477.
2. 青葉高, 高樹英明. 1971. ニンニクの球形成に関する(第3譜)タネ區の貯藏處理ならびに植付け後の日長條件の影響. *日本學雜* 40(3) : 240-245.
3. Ayabe, M. and 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 Reports* 17:773-779.
4. Ayabe, M. and Sumi, S. 2001. A novel and efficient tissue culture method -"stem-disc dome culture"- for producing virus-free garlic(*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports* 20:503-507.
5. Barandiaran, X., Martin, N., Rodriguez-Conde, M.F., Di Pietro, A. and Martin, J. 1999. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic(*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports* 18:434-437.
6. Bhojwan, S.S., Cohen, D. and Fry, P.R.. 1983. production of virus-free garlic and field performance of micropropagated plants. *Scientia Horticulturace* 18:39-43.
7. Chen, T.H.G. and Li, P.H. 1987. In vitro induction of cold acclimation in potato In : Bajaj. Y.P.S(ed). *Biotechnology in agriculture and forestry* vol 3. pp.256-267. Springer-Verlag. Berlin.
8. Chovelon, V., Leroux, J.P., Dore, C. 1990. Se lection sanitaire de l'ail et de l'échalote: culture de me rist'emes et re ge ne ration de varie te s. In: Dore C (ed) *Cinquantenaire de la culture in vitro. Colloques de l'INRA* 51:142-150.
9. Dolores, L.M., Patena, L.F., Barg, E., Green, S.K. 2002. Detection of *Allium* viruses in garlic and shallots using serological and molecular assay. *Philos J Crop Sci* 27:18.
10. Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Michaux-Ferriere, N., and Kahane, R. 2002. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic(*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports* 21: 1-15.

11. Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Michaux-Ferriere, N., Kahane, R. 2002. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 21:197-203.
12. Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Triaire, D., Arnault, I., Auger, J. and Kahane, R. 2005. Establishment of embryogenic cell suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.), plant regeneration and biochemical analyses. *Plant Cell Rep.* 24:319-325.
13. Haque, M.S., Wada, T. and Hattori, K. 1997. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 83-89.
14. 황세구, 김태중. 2006. 한지형마늘 주아재배법 확립에 관한 연구. 농촌진흥청 지역농업개발과제 보고서. P.49-53.
15. Kahane, R., Rancillac, M., Schweisguth, B. 1992. Bulbing in vitro in *Allium* species. *Allium Improve Newsl* 2:18-20.
16. Kim, E.K., Hahn, E.J., Murthy, H.N. and Paek, K.Y. 2003. High frequency of shoot multiple-plication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 231-236.
17. 구영서, 노승균, 이기진, 정동식, 강제철. 1973. 농사시험연구보고 제 16집(원예편) : 99-106.
18. 이은모, 김현숙, 함인기, 이영복. 1996. 우량마늘 유식물체 재분화시 배지 물리성 및 성장조절물질의 효과. *Korean J. Plant Tissue Culture* 23(6):333-337.
19. Lee, E.M. and Lee, Y.B. 1994. Micropropagation of High Quality Garlic through Shoot Tip Culuture I. *식물조직배양학회지* 21:161-166.
20. Lee, E.M. and Lee, Y.B. 1994. Micropropagation of High Quality Garlic through Shoot Tip Culuture II. *식물조직배양학회지* 21:193-199.
21. Lee, E.M. and Lee, Y.B. 1994. Micropropagation of High Quality Garlic through Shoot Tip Culuture III. *식물조직배양학회지* 21:277-280.
22. 이중호. 1969. 마늘의 주아이용재배 및 환경적제에 관하여. *농사시험 연구보고* 12(2):77-81.
23. Linsmair, E.M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of

- tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 18:100-127.
24. Luciani, G.F., Marinangeli, P.A. and Curvetto, N.R. 2001. Increasing nitrate/ammonium ratio for improvement of garlic micropropagation. *Sci. Hort.* 87:11-20.
25. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.
26. Myers, J.M. and Simon, P.W. 1998. Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. *Plant Cell Reports* 17:726-730.
27. Myers, J.M. and Simon, P.W. 1999. Regeneration of garlic callus as affected by clonal variation, plant growth regulators and culture conditions over time. *Plant Cell Reports* 19:32-36.
28. Nagakubo, T., Nagasawa, A., Ohkawa, H. 1993 Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 32:175-183.
29. 백기엽. 1987. 마늘(*Allium sativum* L.)조직 배양체의 토양 활착 증진에 관한 연구. 농시논문집(농업산학협동편) : 71-80.
30. 표현구, 이병일. 1973. 수확후의 마늘의 생리 생태에 관한 기초 연구. *한원지* 4 : 240-245.
31. Robert, U., Zel, J. and Ravnkar, M. 1998. Thermotherapy in virus elimination from garlic. *Sci. Hort.* 73:193-202.
32. Robledo Paz, A., Villalobos Arambula, V.M., Jofre Garfias, A.E. 2000. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by roottip culture. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 36:416-419.
33. Senula, A., Keller, E.R.J., Leseman, D.E., Cassells, A.C., Doyle, B.M., Curry, R.F. 2000. Elimination of viruses through meristem culture and thermotherapy for the establishment of an in vitro collection of garlic (*Allium sativum*). *Acta Horti* 530:121-128.
34. Van Dijk, P. 1994. Virus diseases of *Allium* species and prospects for their control. *Acta. Horti.* 358:299-305.
35. Xue, H.M, Araki, H., Shi, L., Yakuwa, T. 1991. Somatic embryogenesis and

plant regeneration in basal plate and receptacle derived callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). J Jpn Soc Hortic Sci 60:627-634.

36. Zheng, S.J., Henken, B., Krens, F.A., Kik, C. 2003. The development of an efficient cultivar-independent plant regeneration system from callus derived from both apical and non-apical root segments of garlic (*Allium sativum* L.). In Vitro Cell Dev Biol-Plant 39:288-292.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발Table할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발Table 또는 공개하여서는 아니됩니다.